



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* E  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE  
*Baccharis trimera* (Less.) DC.**

**OTALIBIO CASTIGLIONI NUNES**

**VITÓRIA  
2016**



Otalibio Castiglioni Nunes

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* E  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE  
*Baccharis trimera* (Less.) DC.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

VITÓRIA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

N972a Nunes, Otalibio Castiglioni, 1988-  
Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Helicobacter pylori* e  
potencial antioxidante de extratos e frações de *Baccharis trimera*  
(Less.) DC / Otalibio Castiglioni Nunes – 2016.  
96f. : il.

Orientador: Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Estresse oxidativo. 3. Compostos  
Fenólicos. 4. Ação Antioxidante. I. Gonçalves, Rita de Cássia  
Ribeiro. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615

---

Otalibio Castiglioni Nunes

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* E  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Baccharis  
trimera* (Less.) DC.**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 22 de março de 2016 para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de  
concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito  
Santo

**BANCA EXAMINADORA:**



Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso  
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)



Prof. Dr. Warley de Souza Borges  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)



Prof<sup>a</sup>. Dr. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves (orientadora)  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

**Vitória**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

O tempo passa muito rápido. Só Deus sabe o quanto eu precisei andar para estar escrevendo essas palavras. Muitos caminhos, escolhas, lutas, uma batalha a cada dia. Mas enfim, eis que chega o derradeiro momento. Na verdade, um até breve.

Os momentos que precederam o mestrado foram os mais difíceis da minha vida até o momento, mas assim como um clichê dos anos 80, só acaba quando termina. Olho para trás hoje e me orgulho da superação. Foram 2 anos de positividade. Dois anos de trabalho, empenho, angústias mas também de muitas alegrias, muitos amigos. Amigos que espero levar para toda vida. Amigos que tornaram esse caminho mais tranquilo.

Meu esforço, não foi de forma alguma solitário, portanto tenho muito a agradecer...

Agradeço a Deus pelo Dom da vida, por me ajudar a tentar ser a cada dia uma pessoa melhor.

À Meus pais, que sem medo de ser injusto, são os melhores livros que eu já li na minha vida. Cada um do seu jeito. Meu Pai Altamir e minha Mãe Maria da Penha, o amor incondicional que eu recebo de vocês é uma das alegrias que me fazem acreditar que vale a pena viver. Gostaria de representar metade para alguém, do que vocês representam para mim. Viveria tudo de novo com vocês.

Agradeço também, minha namorada Jamara, pelo amor, presença e companhia. Essas três coisas que recebo de você me dão força para seguir em frente. A alegria que você emana é algo impar.

À toda minha família, especialmente minha Vó Adília que perdemos durante o mestrado. Lembro do seu carinho maternal quando ia visitá-la. Uma ferida que certamente não irá sarar.

Aos meus queridos amigos da vida, que, para não ser injusto segue o meu muito obrigado em ordem alfabética: Alciene, André, Augusto, Everaldo, Gabriel, Ildebrando, James, João, Lourenzo, Rafael, Roberto, Rodolfo, vocês de forma direta

contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, a parceria de vocês é algo que sempre me lembrarei. Meus grandes amigos.

Ao professor Rodrigo Kitagawa, que foi um parceiro, um amigo durante o mestrado, a você registro minha gratidão, meu sincero obrigado.

Agradeço a amiga e professora Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves, que mesmo não tendo motivo nenhum, acreditou em mim, espero sinceramente ter correspondido, deixando claro aqui minha profunda gratidão e admiração por você.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, reverencio vocês pela sabedoria e por contribuir com esse projeto.

Agradeço a toda equipe técnica do Departamento de Farmácia da UFES.

A toda equipe do laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR).

O meu muito obrigado também a FAPES e CAPES e a própria UFES pelo apoio financeiro.

**O mundo não é um grande arco-íris. É um lugar sujo,  
um lugar cruel, que não quer saber o quanto você é durão.**

**Vai botar você de joelhos  
e você vai ficar de joelhos para sempre se você deixar.**

**Você, eu, ninguém vai bater tão forte como a vida,  
mas não se trata de bater forte,  
se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente,  
o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando.**

**É assim que se consegue vencer.**

**Sylvester Stallone em "Rocky Balboa"**

## RESUMO

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de úlceras e câncer gástrico é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, que é acompanhada por um considerável estresse oxidativo. No Brasil, a planta *Baccharis trimera* Less. (DC), conhecida como carqueja, é popularmente usada para tratar distúrbios gastrointestinais e do fígado. Nessa espécie já foram identificados taninos, flavonoides, saponinas, lactonas diterpênicas, sesquiterpenos, compostos fenólicos e óleos voláteis. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori* do extrato aquoso, (EAq), etanólico (EE), hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e das frações, aquosa (FAq), hexânica (FHx), e acetone/nitrila/clorofórmio (FAC) obtidas a partir do EH, além de analisar a composição fitoquímica, e seus efeitos sobre radicais livres e oxidantes biológicos. Para todos os extratos e frações foi realizada a triagem fitoquímica e a determinação do teor de polifenóis, flavonoides e taninos totais. A atividade anti-*Helicobacter pylori* foi avaliada por meio do ensaio de microdiluição em caldo e pela capacidade de inibição da enzima urease. A morfologia bacteriana, após exposição às amostras, foi analisada por microscópio eletrônico de varredura (MEV) com o extrato e a fração que atingiram a concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>). A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios de inibição de radicais sintéticos DPPH e ABTS como triagem inicial para todas as amostras. Os ensaios com os oxidantes biológicos, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), ácido hipocloroso (HOCl), radical hidroxil (HO<sup>•</sup>) e óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), foram realizados com o EH, devido aos melhores resultados obtidos no ensaio anti-*H. pylori* e na triagem antioxidante inicial, além de suas frações, exceto a FHx, devido ao baixo desempenho na triagem antioxidante. A maior concentração de polifenóis foi encontrado no EH, flavonoides na FAC e taninos em FAq. No ensaio anti-*H. pylori*, a CIM<sub>90</sub> foi de 512 µg/mL para EH e 1024 µg/mL para FAC a qual foi bactericida. A MEV mostrou alterações morfológicas como alongamento e lise celular nas amostras testadas, podendo sugerir alterações de parede, provavelmente através do comprometimento da síntese de peptidoglicano. No ensaio de inibição da enzima urease o resultado mais expressivo foi o exibido pela FAC, que inibiu 36,24% na maior concentração testada. O melhor resultado dentre os extratos na triagem antioxidante inicial foi do EH, que obteve os seguintes CE<sub>50</sub>: DPPH, 17,40 ± 0,52 e ABTS, 9,99 ± 1,21. Para as frações os melhores CE<sub>50</sub> foram: DPPH, FAq, 27,41 ± 1,65 e ABTS, FAq, 10,80 ± 1,90. No ensaio de captura do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a FAq apresentou CE<sub>50</sub> de 5,85 ± 0,86 µg/mL. No ensaio de inibição do HOCl, todas as amostras testadas conseguiram inibição maior que 50%, exceto a FAq. No ensaio de inibição do radical HO<sup>•</sup>, NO<sup>•</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os resultados foram melhores para FAC e seu CE<sub>50</sub> foi de 2,90 ± 0,48, 132,13 ± 7,38 e 66,70 ± 2,30 µg/mL, respectivamente. As análises indicam que *B. trimera*, especialmente o EH, e suas frações, FAq e FAC, podem apresentar compostos promissores para a prevenção e tratamento de doenças causadas por *H. pylori*. Estes resultados foram embasados pela relação entre a presença de compostos fenólicos e a inibição de oxidantes, além da observação de alterações na membrana bacteriana.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*; *Baccharis trimera*; Estresse oxidativo.



## ABSTRACT

One of the major risk factors for the development of ulcers and gastric cancer is the infection by *Helicobacter pylori*, in which there is a considerable oxidative stress. In Brazil, the plant *Baccharis trimera* (Less) DC, known as "Carqueja", is commonly used to treat gastrointestinal and liver disorders. Tannins, flavonoids, saponins, diterpene lactones, sesquiterpenes, phenolic compounds and volatile oils were identified in this specie. Thus, the goal of this study was to evaluate the anti-*Helicobacter pylori* activity of the aqueous (AqE), ethanolic (EE), and hydroalcoholic (HE) extracts of *B. trimera*, as well as the aqueous (AqF), hexane (HxF), and acetonitrile / chloroform (ACF) fractions obtained from the HE. In addition, it aims to analyze the phytochemical composition and its effects on free radicals and biological oxidants. For all extracts and fractions, it was performed a phytochemical screening and the determination of the content of polyphenol, flavonoid and total tannins. The anti-*Helicobacter pylori* activity was evaluated by microdilution broth assay and urease inhibitory capacity. Bacterial morphology, after sample exposure, was evaluated by scanning electron microscope (SEM) using the extracts and fractions that reached the minimum inhibitory concentration (CIM<sub>90</sub>). Screening of antioxidant activity for all samples was determined by DPPH and ABTS radical scavenging activities. Assays using the oxidizing biological agents, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>), and nitric oxide (NO<sup>•</sup>) were performed with HE and its fractions due the best results in the anti-*H. pylori* and initial screening antioxidant assays, except for the HxF because of its poor performance in the antioxidant screening. The highest concentration of polyphenols was observed in the HE, flavonoids in the ACF, and tannins in the AqF. Anti-*H. pylori* assay presented a CIM<sub>90</sub> of 512 µg/mL for HE, and 1024 µg/mL for ACF, the latter being bactericidal. SEM showed morphological changes such as stretching and cell lysis in the samples tested, and may suggest some modifications in the wall, such as alterations in the peptidoglycan synthesis. In the enzyme urease inhibition assay, the most significant result was obtained by the ACF, which inhibited 36.24% in the highest concentration tested. The best result among the extracts in the initial antioxidant screening was achieved by the HE, which obtained the following EC<sub>50</sub>: DPPH, 17.40 ± 0.52 and ABTS, 9.99 ± 1.21. The best EC<sub>50</sub> for the fractions were: DPPH, AqF, 27.41 ± 1.65, and ABTS, AqF, 10.80 ± 1.90. In the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> scavenging activity, AqF showed EC<sub>50</sub> of 5.85 ± 0.86 µg/mL. In the inhibition assay of HOCl, all samples tested were able to inhibit greater than 50%, except AqF. In the inhibition assay of HO<sup>•</sup>, NO<sup>•</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the results were better for ACF and its EC<sub>50</sub> was 2.90 ± 0.48, 132.13 ± 7.38 e 66.70 ± 2.30 µg/mL, respectively. The analyzes indicate that *B. trimera*, in particular the HE and its fractions, AqF and ACF, may exhibit promising compounds for the prevention and treatment of diseases caused by *H. pylori*. These results were based on the relationship between the presence of phenolic compounds and the inhibition of oxidants, as well as changes in the bacterial membrane.

**Key-words:** *Helicobacter pylori*; *Baccharis trimera*; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Formação esquematizada das espécies reativas de oxigênio durante o <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos.....	22
<b>Figura 2</b> - Resumo do estabelecimento da infecção por <i>H. pylori</i> e suas consequências .....	25
<b>Figura 3</b> - Linha do tempo relacionando a descoberta de novos antibióticos e o surgimento de resistência bacteriana.....	28
<b>Figura 4</b> - Ilustrações de <i>Baccharis trimera</i> em estágio vegetativo .....	30
<b>Figura 5</b> - Resumo dos procedimentos realizados a partir da obtenção dos extratos e frações de <i>B. trimera</i> .....	36
<b>Figura 6</b> - Relação dose-resposta do crescimento de <i>H. pylori</i> na presença dos extratos Aquoso (EAq), Hidroalcoólico (EH) e Etanólico (EE) de <i>B. trimera</i> .....	51
<b>Figura 7</b> - Relação dose-resposta do crescimento de <i>H. pylori</i> na presença das frações, Aquosa (FAq), Acetonitrila/clorofórmio (FAC) e hexânica (FHx) do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> .....	52
<b>Figura 8</b> - Microscopia eletrônica de varredura da bactéria <i>H. pylori</i> na ausência das amostras (figuras A e B) e após exposição a EH (figuras C e D) e FAC (figuras E, F e G) de <i>B. trimera</i> , com aumento variando de 8.000 a 20.000x.....	55
<b>Figura 9</b> - Relação entre a concentração e a inibição da enzima urease para o Extrato hidroalcoólico (EH), Extrato aquoso (EAq) e Extrato etanólico (EE) de <i>B. trimera</i> .....	56
<b>Figura 10</b> - Relação entre a concentração e a inibição da enzima urease para a Fração acetonitrila/clorofórmio (FAC), Fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> .....	57
<b>Figura 11</b> - Porcentagem de inibição do extrato aquoso (EAq), Extrato hidroalcoólico (EH) e Extrato Etanólico (EE) de <i>B. trimera</i> para o teste de captura do radical ABTS•+.....	60

<b>Figura 12</b> - Porcentagem de inibição da fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC), fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> para o teste de captura do radical ABTS <sup>•+</sup> . ....	61
<b>Figura 13</b> - Porcentagem de inibição do extrato aquoso (EAq), Extrato hidroalcoólico (EH) e Extrato Etanólico (EE) de <i>B. trimera</i> para o teste de captura do radical DPPH. ....	62
<b>Figura 14</b> - Porcentagem de inibição da fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC), fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> para o teste de captura do radical DPPH. ....	63
<b>Figura 15</b> - Porcentagem de inibição do HOCl na presença de diferentes concentrações de TROLOX (controle), do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> e suas frações acetonitrila/clorofórmio (FAC) e aquosa (FAq).....	64
<b>Figura 16</b> - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	66
<b>Figura 17</b> - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	67
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do HO <sup>•</sup> .....	68
<b>Figura 19</b> - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do NO <sup>•</sup> . ....	70
<b>Figura 20</b> - Núcleo central de flavonoides (A); Flavonoide quercetina e algumas características importantes para atividade antioxidante de flavonoides (B).....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Caracterização fitoquímica preliminar dos extratos aquoso (EAq), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE) de <i>B. trimera</i> . ....	47
<b>Tabela 2</b> - Caracterização fitoquímica preliminar das frações aquosa (FAq), acetonitrila/clorofórmio (FAC) e hexânica (FHx), obtidas a partir do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>B. trimera</i> . ....	48
<b>Tabela 3</b> - Valores da determinação do conteúdo de flavonoides, taninos e polifenóis totais. ....	50
<b>Tabela 4</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do Extrato hidroalcoólico (EH) e Fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC) de <i>B. trimera</i> , bem como controles antimicrobianos (Amoxicilina e Metronidazol). ....	53
<b>Tabela 5</b> - Resultados de $CE_{50} \pm$ Desvio padrão ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os ensaios de atividade antioxidante. ....	58
<b>Tabela 6</b> - Valores do $r$ de Pearson com correlação negativa significativa, em relação aos resultados de $CE_{50}$ dos diferentes ensaios de atividade antioxidante e o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos totais. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABTS** - ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

***babA*** - *Blood group antigen adhesin gene*

**BHI** - *Brain Heart Infusion*

***cagA*** - *cytotoxin-associated gene A*

***cagE*** - *cytotoxin-associated gene E*

**CBM** - concentração bactericida mínima

**CE<sub>50</sub>** - concentração efetiva 50%

**CFT** - conteúdo de flavonoides totais

**CIM** - concentração inibitória mínima

**CPT** - conteúdo de polifenóis totais

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DPPH** - 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

**DTNB** - ácido 5-5'-ditio (2-nitrobenzóico)

**EAG** - equivalentes de ácido gálico

**EAq** - extrato aquoso

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético

**EE** - extrato etanólico

**EH** - extrato hidroalcoólico

**ERN** - espécies reativas de nitrogênio

**ERO** - espécies reativas de oxigênio

**ERT** - equivalentes de rutina

**FAC** - fração acetonitrila/clorofórmio

**FAq** - fração aquosa

**FHx** - fração hexânica

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - peróxido de hidrogênio

**HNO<sub>2</sub>** - ácido nitroso

**HO<sup>•</sup>** - radical hidroxil

**HOCl** - ácido hipocloroso

**KOH** - hidróxido de potássio

**MALT** - Tecido Linfóide associado a mucosa

**MDA** - malondialdeído

**MEV** - microscopia eletrônica de varredura

**MPO** - mieloperoxidase

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** - óxido nitroso

**NaBH<sub>4</sub>** - borohidreto de sódio

**NADH** - dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NADPH oxidase** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**NaOH** - hidróxido de sódio

***napA*** - *neutrophil-activating protein A*

**NAP-HP** - proteína de ativação de neutrófilo para *Helicobacter pylori*

**NBT** - nitrobluetetrazolium

**NO<sup>•</sup>** - óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - nitrato

**NOS** - óxido nítrico sintase

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - ânion superóxido

**ONOO<sup>-</sup>** - peroxidonitrito

**PBP** - *Penicillin Binding Protein*

**PMS** - metassulfato de fenazina

**RO<sup>•</sup>** - alcóxil

**ROO<sup>•</sup>** - peróxil

**SOD** - superóxido dismutase

**TNB** - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

**TROLOX** - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

**TT** - Taninos totais

***vacA*** - *vacuolating cytotoxin gene A*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	35
3.1	MATERIAL VEGETAL	35
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	35
3.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR	36
3.4	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS TOTAIS	37
3.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS	37
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>H. PYLORI</i>	38
<b>3.6.1</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b>	38
3.6.1.1	Antimicrobianos padrões	38
3.6.1.2	Extratos	38
3.6.1.3	Microrganismo	39
3.6.1.4	Procedimento	39
<b>3.6.2</b>	<b>Análise morfológica da bactéria <i>H. pylori</i></b>	40
<b>3.6.3</b>	<b>Ensaio de inibição da enzima Urease</b>	40
3.7	ENSAIOS ANTIOXIDANTES	41



3.7.1	Ensaio de captura do radical ABTS•+	41
3.7.2	Ensaio de captura do radical DPPH	42
3.7.3	Ensaio de captura do Ácido Hipocloroso (HOCl)	42
3.7.4	Ensaio de captura do Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	43
3.7.5	Ensaio de captura do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	43
3.7.6	Ensaio de captura do radical Hidroxil ( $HO^{\cdot}$ )	44
3.7.7	Ensaio de captura do Óxido Nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	44
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4	<b>RESULTADOS</b>	46
4.1	PREPARO DOS EXTRATOS E FRACIONAMENTO	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	46
4.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS	48
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>H. pylori</i>	51
4.5	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA UREASE	56
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	57
4.6.1	Ensaio de captura do radical ABTS•+	59
4.6.2	Ensaio de captura do radical DPPH	62
4.6.3	Ensaio de captura do Ácido Hipocloroso (HOCl)	64
4.6.4	Ensaio de captura do Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	65
4.6.5	Ensaio de captura do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	66
4.6.6	Ensaio de captura do radical Hidroxil ( $HO^{\cdot}$ )	67

4.6.7	Ensaio de captura do Óxido Nítrico (NO <sup>•</sup> ) .....	69
5	DISCUSSÃO .....	71
6	CONCLUSÃO .....	81
7	REFERÊNCIAS .....	83
8	APÊNDICE .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de estômago representa uma importante causa de óbito em todo o mundo. Em termos globais o câncer gástrico é o segundo tipo de câncer que mais causou mortes em 2013 na população mundial, e em relação a prevalência foi o quinto em número de casos (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015). No Brasil, também tem sua importância no perfil de mortalidade, uma vez que está entre os dez cânceres mais incidentes no país, inclusive, considerando ambos os sexos (INCA, 2015). Mais de 70% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento e parecem estar associados a diferentes fatores de risco, como elevado consumo de sal, infecções, fumo, dentre outras (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015; JEMAL et al., 2011).

A presença da bactéria *Helicobacter pylori* é um fator importante na patogênese do câncer gástrico (SUGANO et al., 2015). O conhecimento acumulado conduziu a sua classificação como fator crucial ligado ao processo de carcinogênese (WEN; MOSS, 2009). Estima-se que em países em desenvolvimento, o risco da prevalência de câncer gástrico mediada por *H. pylori*, seja alta, em torno de 75% (PARKIN, 2006; POLK; PEEK, 2010).

A infecção por *H. pylori* pode levar a progressivos danos na mucosa gástrica e tem sido demonstrada como responsável por outras doenças, dentre elas estão, a gastrite, o linfoma gástrico MALT (Tecido linfóide associado a mucosa) e as úlceras. Atualmente, representa o fator etiológico mais comumente associado à úlcera péptica, onde mais de 70% dos infectados são assintomáticos, e deste valor, 10 a 20% podem desenvolver essa doença durante a vida (SUGANO et al., 2015; VÍTOR; VALE, 2011; VOMERO; COLPO, 2014; WATARI et al., 2014).

A *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, espiralada e microaerófila, tipicamente colonizadora do estômago humano, podendo habitar o mesmo por várias décadas sem a ocorrência de consequências adversas. No entanto, a infecção persistente pela bactéria também pode levar ao desenvolvimento de progressivas lesões na mucosa gástrica. Sendo que, o risco do desenvolvimento de doenças pépticas em indivíduos portadores de *H. pylori* está relacionado às

características da cepa em questão e da resposta do hospedeiro frente à bactéria (AYALA et al., 2011; COVER; BLASER, 2009; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; MARSHALL; WARREN, 1984; SUGANO et al., 2015; WEN; MOSS, 2009).

O ser humano é o reservatório principal dessa bactéria, sua transmissão é de pessoa para pessoa, pelas vias fecal-oral e oral-oral, sendo adquirida principalmente na infância. Alguns fatores que favorecem a infecção devem ser observados, como por exemplo, idade, fatores socioeconômicos, precárias condições de higiene, aglomeração nas moradias e um sistema de saneamento básico deficiente ou até mesmo ausente (BITTENCOURT et al., 2006).

Na infecção do *H. pylori*, um dos fatores essenciais para a sobrevivência relacionados a bactéria, é a resistência ao ácido clorídrico. Nesse sentido a bactéria produz urease, um fator de virulência, que se constitui em uma proteína de alto peso molecular, que pode estar presente extracelularmente, ou intracelularmente. Esta enzima promove a utilização da uréia lançada ou formada no lúmen gástrico, levando a produção de amônia, promovendo a formação de um microambiente menos ácido em torno da bactéria. Para a liberação de urease no ambiente colonizado, o processo de autólise da célula bacteriana, é fundamental e reflete na consequente adsorção de urease na bactéria intacta (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; PHADNIS et al., 1996; WEEKS; SACHS, 2001).

Outra estratégia que possibilita a bactéria se beneficiar da presença de ureia, favorecendo a atividade da urease, é a presença da enzima arginase. Esta catalisa a hidrólise de L-arginina para a obtenção de L-ornitina e uréia. Esta enzima está presente em quase todas formas de vida, inclusive na bactéria *H. pylori*. Nessa bactéria a arginase é codificada pelo gene *rocF*. Basicamente, a arginase compete com a óxido nítrico sintase do indivíduo pela L-arginina presente no meio. Sendo assim, existe uma redução na síntese de óxido nítrico, que é uma espécie reativa com efetivo poder antimicrobiano. Estirpes arginase positivo demonstraram maior potencial de sobreviver ao meio ácido estomacal, ao contrário de cepas arginase-deficiente que apresentaram atenuada colonização em modelos animais (DAS et al., 2010).

As diversas variações genômicas encontradas em cepas de *H. pylori* estão envolvidas com a codificação de vários fatores de virulência relacionados com o estabelecimento de lesões no hospedeiro (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Como exemplo podemos citar, a proteína ativadora de neutrófilos (HP-NAP) e o gene *cagA* que é considerado marcador da ilha de patogenicidade PAI (*cag-PAI*), estes, dentre outras coisas, induzem os neutrófilos a produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) (BERNARD; D'ELIOS, 2010; MONTEMURRO et al., 2001; NAITO; YOSHIKAWA, 2002; ZHANG et al., 1996).

Além destes, outro fator de virulência muito importante é o gene *vacA*, que está associado a liberação de uréia para o lúmen gástrico, vacuolização da célula e formação de canais na membrana, culminando na apoptose celular. O *vacA* também parece estar relacionado a diminuição da disponibilidade da glutatona e de glutatona redutase, corroborando para o déficit antioxidante. Outros genes também podem ser citados como o *cagE* essencial para o estabelecimento da resposta inflamatória e o gene *babA*, que estaria envolvido com a aderência da bactéria no hospedeiro (COVER; BLASER, 2009; GERHARD et al., 1999; KIMURA et al., 2001; LIMA; ROBENHORST, 2009; NAITO; YOSHIKAWA, 2002; NETO, 2010; TOMBOLA et al., 2001).

Outros estudos têm demonstrado que durante o processo de infecção pela bactéria *H. pylori* ocorre um aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio na mucosa gástrica (DING et al., 2007) e que a dissonância entre os oxidantes gerados e o sistema antioxidante, nessa região, pode estar associada a morte celular ou a alterações no DNA celular, auxiliando na patogenicidade (GULEC et al., 2013; SMOOT et al., 2000).

A liberação de espécies reativas tem papel central durante a infecção por *H. pylori*. Sua formação ocorre com a função de eliminar a bactéria (BHATTACHARYYA et al., 2014). Entretanto, este microrganismo dispõe de sofisticados mecanismos capazes de minimizar os efeitos deletérios oriundos dessas espécies reativas, como a presença de enzimas. É possível mencionar a superóxido dismutase, que a partir da reação entre duas moléculas de ânion superóxido leva a formação de peróxido de hidrogênio, a catalase, responsável por clivar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e as peroxiredoxinas que clivam peróxidos. Outros fatores como as

proteínas armazenadoras de ferro, também tem papel relevante na proteção da bactéria, já que de forma indireta são capazes de minimizar a formação do radical hidroxil (WANG; ALAMURI; MAIER, 2006). Sendo assim, o processo de infecção por *H. pylori* estimula a geração de espécies reativas no ambiente epitelial gástrico, mas estas não são efetivas na eliminação da bactéria. O excesso destes oxidantes, juntamente com a instalação do patógeno irão favorecer os danos gástricos e o processo inflamatório.

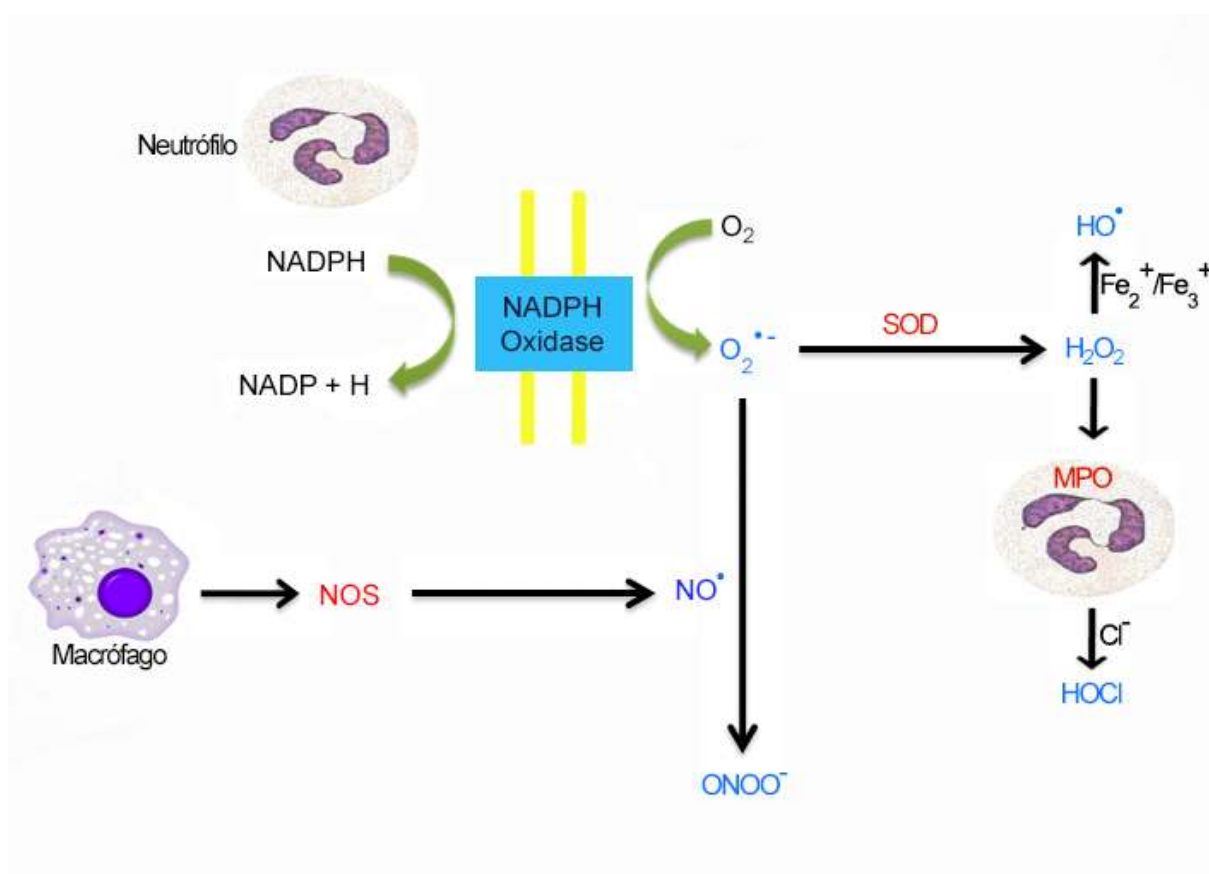
As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são subprodutos do metabolismo celular normal. Quantidades baixas a moderadas têm efeitos benéficos em vários processos fisiológicos, incluindo morte de agentes patogênicos em processo infecciosos, cicatrização de feridas, e processos de reparação tecidual (BHATTACHARYYA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, essas espécies reativas quando em excesso, culminam no evento chamado de estresse oxidativo, que é fator importante no estabelecimento de diversos estados patogênicos como, câncer, doenças neurológicas, hipertensão, aterosclerose e doenças gastrointestinais (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BRIEGER et al., 2012; LIN et al., 2014).

As principais ERO distinguem-se em dois grandes grupos, as radicalares, como por exemplo: hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ); e as não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Já as ERN compreendem o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A formação inicial de ERO em processos infecciosos ocorre durante o *burst* oxidativo (Figura 1). A enzima NADPH oxidase, presente em neutrófilos e macrófagos, tem um papel crucial, sendo responsável pela transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio extracelular ou fagolisossomal, promovendo a redução do oxigênio molecular, formando o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Tal complexo enzimático apresenta componentes no citoplasma e na membrana celular. Em resposta a estímulos bacterianos, ocorre a translocação das subunidades citosólicas para as subunidades na membrana celular, promovendo a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido, através da ativação da enzima NADPH-oxidase permitindo o início de

sua atividade catalítica (ALLEN; MCCAFFREY, 2007; BERNARD; D'ELIOS, 2010; RABÊLO et al., 2010).

Em estudo realizado por Allen et al. (2005) foi demonstrado que além de a *H. pylori* ter a capacidade de induzir um forte *burst* oxidativo em neutrófilos, é também capaz de modular a NADPH-oxidase, impedindo a liberação do  $O_2^{\bullet -}$  dentro dos fagossomos contendo a bactéria, acumulando essa espécie reativa no meio extracelular. Dessa forma entende-se que a infecção por *H. pylori* altera o tráfego das subunidades da NADPH oxidase, de modo que os complexos tendem a se acumular na membrana celular da célula infectada e não no fagossomo bacteriano. Este fato leva a inibição do acúmulo de complexos NADPH oxidase funcionais, minimizando a geração de EROs intrafagossomais, protegendo a bactéria, porém colaboram para induzir danos no tecido hospedeiro, já que o acúmulo de espécies reativas passa a ser no espaço extracelular.



**Figura 1** - Formação esquematizada das espécies reativas de oxigênio durante o *burst* oxidativo de neutrófilos (adaptado de HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998).

Em torno de 2% do oxigênio molecular consumido acaba por ser convertido em  $O_2^{\cdot-}$ , sob condições fisiológicas normais. Em linhas gerais, o  $O_2^{\cdot-}$  formado exibe uma importante atividade biológica que é a capacidade de eliminar agentes patogênicos. Entretanto ele tem meia vida curta e não é capaz de atravessar membranas, podendo ser prontamente reduzido pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou através da dismutação espontânea em  $H_2O_2$ . Parte do  $O_2^{\cdot-}$  formado inicialmente pode ainda reagir com o  $NO^{\cdot}$ , gerando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é uma espécie reativa altamente lesiva frente a biomacromoléculas (BABIOR, 1997; BRIEGER et al., 2012; KIM, 2005; KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011; PINHO et al., 2009; WINK; MITCHELL, 1998).

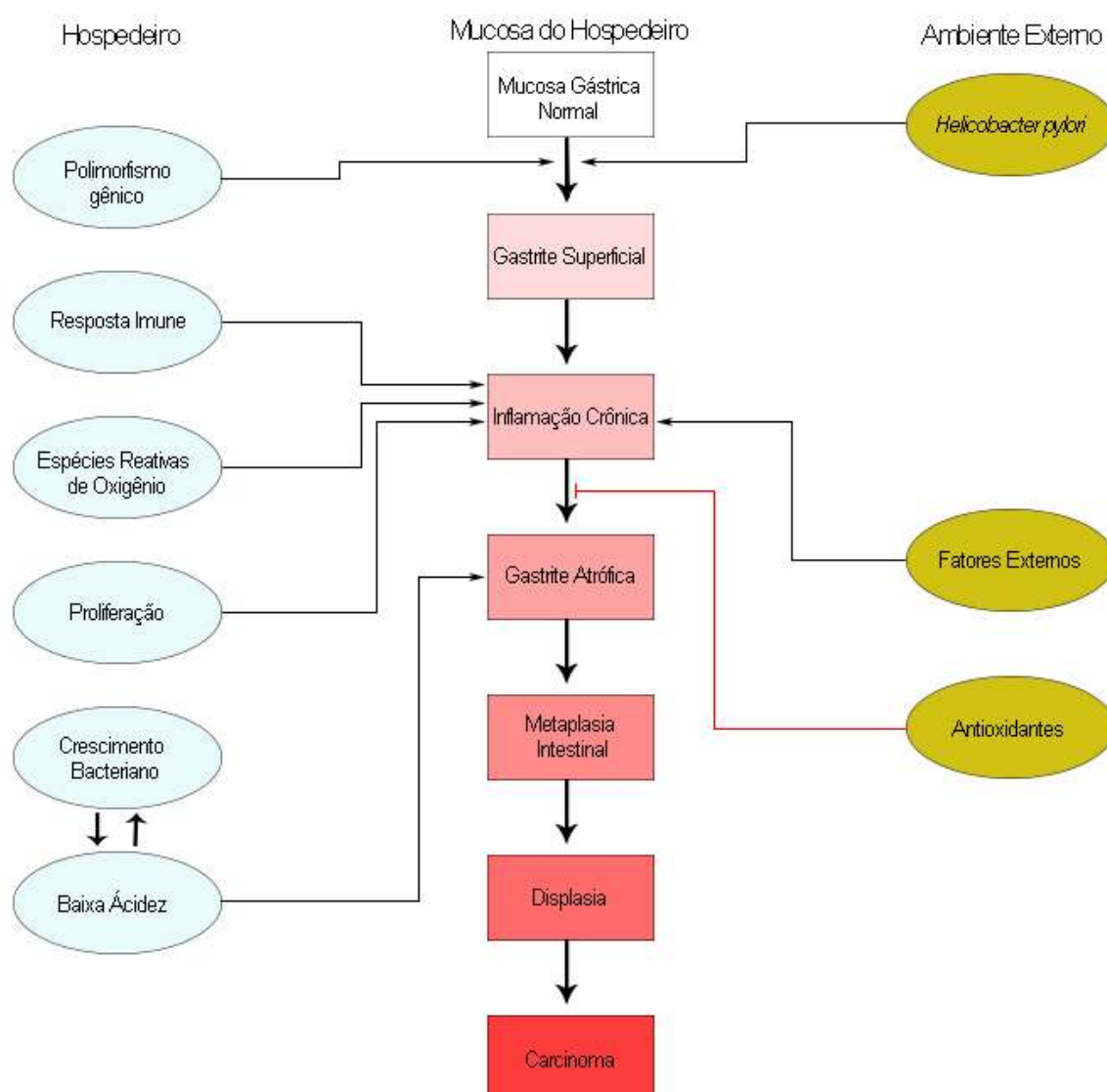
O  $H_2O_2$  formado através da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  pode ser usado em outras reações catalisadas pela catalase e glutathione peroxidase, ambas no citosol, ou pode sofrer a ação da mieloperoxidase (MPO) (BAUD et al., 2004; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; ROOT et al., 1975; VEAL; DAY; MORGAN, 2007). A enzima MPO presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos catalisa a oxidação do cloreto ( $Cl^-$ ) na presença de  $H_2O_2$  e assim é capaz de convertê-lo em  $HOCl$  (Figura 1). Esse composto produzido é um poderoso oxidante que pode estar associado a danos em tecidos do hospedeiro, através de lesões inflamatórias graves. Pode também formar outros oxidantes como por exemplo, cloraminas (NAITO; YOSHIKAWA, 2002; PULLAR; VISSERS; WINTERBOURN, 2000).

Apesar de inócuo isoladamente, o  $H_2O_2$  pode atravessar membranas celulares e devido ao fato das células possuírem metais de transição em seu interior pode haver a formação de um radical altamente lesivo, o radical  $HO^{\cdot}$  (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A produção excessiva de  $HO^{\cdot}$  pode causar lesões de forma direta ou indireta. As lesões ditas diretas são geradas sobre estruturas celulares ou compostos orgânicos, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos e necessitam da presença do íon ferro. Já as lesões indiretas são formadas devido a alterações de homeostase do cálcio intracelular, que culminam com um aumento do cálcio citosólico podendo ativar a xantina oxidase, induzindo a geração de  $O_2^{\cdot-}$ , e a fosfolipase  $A_2$  estimulando o processo inflamatório (BALBOA; PEREZ; BALSINDE, 2014; BOILARD et al., 2010; RODRIGUES, 1998).



A infecção por *H. pylori* estimula uma resposta imune duradoura, inclusive com grande produção de espécies reativas, que pode persistir durante a vida do infectado na ausência da antibioticoterapia de erradicação. A combinação de fatores bacterianos, como os fatores de virulência, fatores ambientais, e a resposta imune do hospedeiro, favorecem a iniciação e a progressão da atrofia da mucosa, metaplasia e displasia até o câncer gástrico. Em linhas gerais o processo de estabelecimento do câncer gástrico tem como componentes básicos, a gastrite crônica não atrófica, atrofia multifocal, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma invasivo. A principal hipótese da capacidade neoplásica da infecção é o envolvimento do estresse oxidativo (CORREA; HOUGHTON, 2007; DING et al., 2007; WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

O processo de infecção por *H. pylori*, associado a participação de ERO, está resumido na figura 2. O esquema mostra que o avanço do dano gástrico é uma relação entre o crescimento bacteriano local, resposta imune e formação de espécies reativas, levando ao estabelecimento de inflamações crônicas, que pode culminar em gastrite atrófica, metaplasia intestinal e carcinoma. Além disso, outros fatores de risco, oriundos do meio externo, como o uso de cigarro, elevado consumo de álcool podem contribuir para o avanço deste processo lesivo.



**Figura 2** - Resumo do estabelecimento da infecção por *H. pylori* e suas conseqüências (Adaptado de WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

Entre as ERN destacamos o  $\text{NO}^*$  que desempenha importantes funções fisiológicas, como por exemplo na manutenção do fluxo sanguíneo, mas que também está relacionado ao desenvolvimento de processos fisiopatológicos. Durante infecções por *H. pylori* são produzidas grandes quantidades de  $\text{NO}^*$ , através da expressão de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) em células epiteliais gástricas, que podem levar a apoptose celular. Isto pode ser, não em decorrência do  $\text{NO}^*$  sozinho, uma vez que trata-se de uma espécie de baixa reatividade, mas sim pela reação que este pode realizar com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , comumente presente em processos

infecciosos, gerando  $\text{ONOO}^-$ . Alguns autores consideram que o  $\text{NO}^*$  pode desempenhar efeitos diretos e efeitos indiretos. Em baixas concentrações ( $<1\mu\text{M}$ ), os efeitos são tidos diretos. Já quando existe um aumento excessivo ( $>1\mu\text{M}$ ) na produção de  $\text{NO}^*$ , este pode se envolver na formação de outras ERNs, que possuem alta reatividade, e seriam responsáveis pelos danos causados (KIM, 2005; WINK; MITCHELL, 1998).

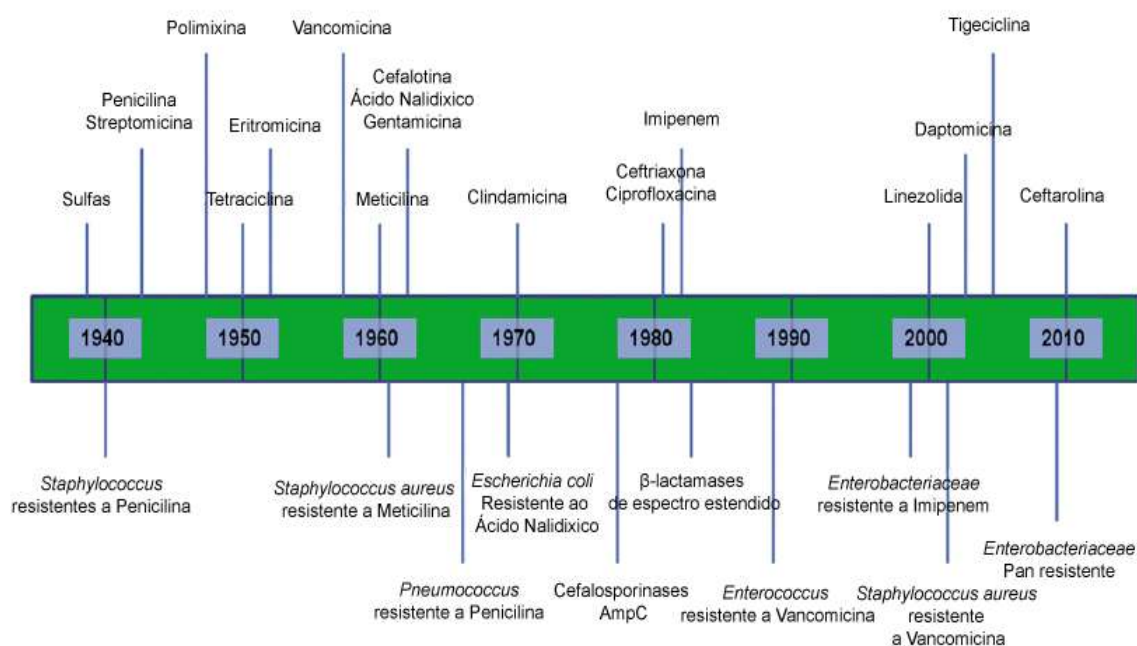
Os efeitos lesivos gerados pelas espécies reativas são geralmente combatidas por defesas antioxidantes enzimáticas (Ex: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase), ou por antioxidantes não enzimáticos (Ex: vitamina C, vitamina E, carotenóides, polifenóis) (BIRBEN et al., 2012). Os metabólitos secundários de plantas como, flavonoides e taninos, são conhecidos devido a sua capacidade antioxidante, com isso são potencialmente capazes de minimizar o efeito lesivo do estresse oxidativo (HERAS et al., 1998; MIRABALLES; GÁMBARO; ARES, 2013). Os compostos fenólicos possuem uma estrutura química capaz de desempenhar essa atividade antioxidante. Essa habilidade está associada a presença de hidroxilas, podendo doar um átomo de hidrogênio ou elétron para a espécie reativa. Outra característica importante dos polifenóis é o sistema aromático conjugado estendido, capaz de deslocalizar o elétron desemparelhado mantendo a estrutura estável (DAI; MUMPER, 2010).

Como forma clássica de tratamento para a infecção por *H. pylori*, tem-se utilizado os inibidores da bomba de prótons, associado a dois antibióticos (BITTENCOURT et al., 2006; COELHO et al., 2004), sendo amoxicilina, claritromicina e o metronidazol os antibióticos mais utilizados (CHEY; WONG, 2007; SELGRAD; BORNSCHEIN; MALFERTHEINER, 2011). Porém antibióticos como levofloxacina, tetraciclina e rifabutina também tem demonstrado atividade frente a *H. pylori* (MÉGRAUD, 2013). A duração do tratamento clássico (7-14 dias) também pode ser prejudicial a terapêutica, dificultando a adesão e, somado a isso, a elevação das taxas de resistência ao tratamento clássico é preocupante (MAZZOLENI; MAZZOLENI, 2010; SILVA et al., 2015b; WANNMACHER, 2011). Aliado a isso, o simples local de infecção por *H. pylori* já fornece a bactéria uma vantagem de sobrevivência, uma vez que dentro do estômago a difusão dos medicamentos é limitada e o pH é menor do que o necessário para os antibióticos disponíveis no mercado terem atividade. *H. pylori* também demonstra um

crescimento lento, este pode se apresentar também como uma vantagem, devido ao fato de que a maioria dos antibióticos atuais são mais eficazes no momento de multiplicação bacteriana (GRAHAM, 1998).

Em relação aos antibióticos especificamente, a resistência a amoxicilina pode se dar devido a ausência de uma das quatro PBPs (*Penicillin Binding Protein*) comumente alvo deste antibiótico. Este fato culminaria com a diminuição da atividade antimicrobiana. Para o metronidazol, por exemplo, a resistência para este medicamento e seus análogos, parece ser causada pela diminuição da capacidade bacteriana em reduzir o grupo nitro, presente na molécula, diminuindo a formação de compostos tóxicos. Este fato minimizaria danos ao DNA bacteriano. Já, em relação aos macrolídeos, como a claritromicina, alterações no RNA ribossomal 23S diminuiriam a afinidade do antibiótico com seu alvo de ação, com consequente diminuição da atividade do medicamento (MEGRAUD, 1998).

A indústria farmacêutica ao longo dos anos aumentou a produção de novos antimicrobianos, porém ao passo que houve esse aumento na produção, também houve o estabelecimento de uma crescente resistência bacteriana frente a esses medicamentos. O aumento da resistência bacteriana tornou-se cada vez mais comum em meados de 1970, entretanto esses eventos de resistência foram inicialmente acompanhados pelo descobrimento e desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana capazes de superar ou burlar esses mecanismos de resistência. Todavia, desde a década de 1990, inovações terapêuticas antimicrobianas tem se tornado cada vez mais raras, levando a um considerável desequilíbrio entre a resistência bacteriana e o desenvolvimento de novos compostos (TANG; APISARNTHANARAK; HSU, 2014). O alarmante quadro de aquisição de resistência bacteriana, desde a década de 1940, pode ser resumido na figura 3.



**Figura 3** - Linha do tempo relacionando a descoberta de novos antibióticos e o surgimento de resistência bacteriana (Adaptado de TANG; APISARNTHANARAK; HSU, 2014).

Considerando o panorama atual, tornou-se comum a busca por novos princípios ativos que sejam uma alternativa aos fármacos presentes no mercado. Nesse contexto, os produtos naturais tornaram-se um atrativo em virtude da grande variedade de espécies de plantas que ainda precisam ser estudadas. No Brasil, em torno de 82% da população faz uso de produtos oriundos de plantas medicinais em seus cuidados com a saúde, se utilizando do conhecimento obtido pela medicina popular, passada entre as gerações, ou ainda com base nos princípios e diretrizes do SUS (BRASIL, 2012). Por exemplo, estudos têm apontado que várias espécies vegetais, usadas popularmente em distúrbios gástricos, tem potencial de inibir a secreção ácida e desempenhar atividade antioxidante, como é o caso da *Baccharis trimera* (GAMBERINI et al., 1991; GEETHA et al., 2002; PAUL et al., 2009).

Espécies pertencentes ao gênero *Baccharis* são encontradas na forma de arbustos bastante ramificados. Apresentam as inflorescências do tipo capítulo, localizada nas laterais dos ramos, de cor esbranquiçada. Medem em torno de 0,5 a 4,0 m de altura. Tem importante valor sócio econômico e apresenta grande distribuição no sul e sudeste do Brasil, embora também seja possível encontrá-las em outras regiões (KARAM et al., 2013; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido estudada desde o ano de 1900, e mais de 150 compostos foram isolados e identificados até os dias de hoje. Dentro do gênero, é importante ressaltar a espécie *Baccharis trimera*, que é conhecida popularmente como "carqueja", e seu chá é usado para tratar doenças digestivas e do fígado (Figura 4) (ABAD; BERMEJO, 2007; GARLET; IRGANG, 2001). Nessa espécie já foram identificados taninos, flavonoides, saponinas, lactonas diterpênicas, sesquiterpenos, compostos fenólicos e óleos voláteis (GRANCE et al., 2008, apud, SIMÕES et al., 1988, p. 173). Por exemplo, já foram isolados do extrato metanólico das folhas de *B. trimera*, quatro flavonoides, 5,4'-diidroxí-7- metoxiflavona (genkwanina), 5,7,4'-triidroxí-6-metoxiflavona (hispidulina), 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina) e 5,7,4'-triidroxiflavona (apigenina), que demonstraram atividade antimutagênica. Já a partir do extrato em acetato de etila, outros três flavonoides foram isolados, 5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (luteolina), 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina) e 5,7,3',4'-tetraidroxí-6-metoxiflavona (nepetina). Importante ressaltar que os flavonoides, por exemplo, genkwanina e apigenina, apresentaram atividade antibacteriana, indicando a importância de flavonoides na busca por compostos com atividade antimicrobiana. Além dos flavonoides, diterpenos como o clerodano é um importante constituinte desta planta, e tem ação vasorelaxante (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).





**Figura 4** - Ilustrações de *Baccharis trimera* em estágio vegetativo. Fotos tiradas no Parque Municipal Tabuazeiro em Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Alguns estudos têm comprovado os efeitos biológicos da carqueja. Paul et al. (2009) demonstraram que o extrato aquoso tem atividade anti-inflamatória, e foi sugerido que este efeito ocorreu devido a presença de flavonoides. No estudo de Vieira et al. (2011) foi demonstrado que o extrato aquoso e etanólico tiveram forte atividade no teste de inibição do radical DPPH e uma grande capacidade de

neutralizar o radical HO<sup>•</sup>. Já no estudo de Pádua et al. (2010) o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* diminuiu a liberação de espécies reativas, em neutrófilos de ratos. Além de efeitos antioxidantes, estudos realizados por Betoni et al. (2006), mostraram que a espécie *B. trimera* apresentou sinergismo com antimicrobianos tradicionais frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Outros trabalhos também já descreveram uma promissora atividade antiparasitária e de relaxamento muscular de compostos oriundos de *B. trimera*. O óleo essencial obtido das folhas de *B. trimera*, contendo predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos, demonstrou a capacidade em influenciar na viabilidade do parasita *Schistosoma mansoni*. Mais especificamente foi observado perda de 100% da motilidade do parasita quando exposto ao óleo essencial por um período de 48h, e também foi observada alteração da capacidade de reprodução do parasita, além da ocorrência de alterações morfológicas que comprometem a sua sobrevivência (OLIVEIRA et al., 2012). Outra atividade citada em relação a carqueja, é a capacidade de relaxamento vascular. De acordo com Torres et al. (2000) um diterpeno isolado de *B. trimera* foi capaz de bloquear a contração vascular induzida por cálcio podendo refletir na vasodilatação e na melhora da circulação sanguínea.

Em um trabalho realizado por Biondo et al. (2011), o extrato aquoso de *B. trimera* apresentou a capacidade de diminuir o volume e a acidez da secreção gástrica em modelos animais por atuar, possivelmente na via regulatória colinérgica. Todavia, o extrato também contém constituintes ativos que teriam a capacidade de gerar inibição moderada da via regulatória histaminérgica de secreção ácida, contribuindo para a provável atividade anti-úlceras do extrato aquoso de *B. trimera*.

Rodrigues et al. (2009) ressaltam a possibilidade de que o extrato aquoso de *B. trimera* também possa conter compostos capazes de induzir a expressão gênica de enzimas antioxidantes, uma vez que, ao utilizar uma única dose desse extrato em ratos não houve proteção contra o dano oxidativo ao DNA causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém após três tentativas repetidas houve proteção ao DNA frente ao dano oxidativo oriundo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo a capacidade de induzir a expressão de enzimas antioxidantes. Uma possibilidade seria a atuação no sistema Nrf2/Irf2 (Keap1), que basicamente são sensores celulares comumente relacionados ao estresse oxidativo por exemplo, sendo responsáveis, dentre outras funções, pelo aumento da



expressão de genes que levariam a elevação da concentração de proteínas antioxidantes, favorecendo a proteção celular contra o estresse oxidativo (KASPAR; NITURE; JAISWAL, 2009).

Outro aspecto importante a ser abordado, é o nível de toxicidade de preparações a partir de *B. trimera*. Em um estudo realizado por Dias Toledo, (2008) o extrato bruto hidroalcoólico (70%) demonstrou baixa toxicidade em camundongos da linhagem Swiss. Em outro trabalho conduzido por Silva et al., (2015a), foi avaliado a toxicidade aguda e sub-crônica da tintura de *B. trimera* usando ratos como modelos animais. Os resultados indicaram que a tintura aplicada é considerada segura, não causando morte nem sintomas de toxicidade nos animais, tanto em administração única de 2000 mg/kg da tintura, como também sob a administração durante 28 dias de 100, 200, 400 mg/kg da tintura. Parâmetros hematológicos como por exemplo, o número de células vermelhas, células brancas, e parâmetros bioquímicos, como uréia e creatinina, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. Entretanto, um achado importante, após a administração sub-crônica segundo os autores, foi a visualização da diminuição de transaminases hepáticas corroborando seu uso popular, para o tratamento de doenças do fígado.

No Brasil, apesar do número crescente de estudos com plantas, o uso de *B. trimera* e de diversas outras espécies vegetais ainda está amplamente associado ao conceito popular. Sendo assim, na tentativa de orientar pesquisas indicando determinadas plantas medicinais como possíveis itens capazes de gerar produtos de interesse ao SUS, o ministério da saúde Brasileiro elaborou e publicou em Fevereiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Dentre as 71 plantas citadas nessa lista, encontra-se a *Baccharis trimera* (BRASIL, 2009).

No entanto, ainda é necessário um aprofundamento nos estudos que avaliem o verdadeiro potencial das plantas medicinais e que demonstrem efetivamente sua eficácia e segurança. Considerando o exposto, torna-se importante avaliar a atividade anti-*H. pylori* e o efeito de inibição de oxidantes sintéticos e biológicos dos extratos e frações de *B. trimera*, visando corroborar com os estudos que possam viabilizar o seu uso futuro no tratamento e prevenção de distúrbios gastrointestinais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-*H. pylori* e o potencial antioxidante de extratos e frações de *B. trimera* (Less.) DC, identificando as amostras que apresentam maior atividade biológica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de diferentes extratos obtidos de *B. trimera*:

- Realizar a caracterização fitoquímica e determinar o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos totais;
- Avaliar a atividade antioxidante preliminar, frente a inibição dos radicais sintéticos DPPH e ABTS;
- Avaliar a atividade anti-*H. pylori* e de inibição da enzima urease e determinar a concentração inibitória mínima e sub-inibitória e a concentração bactericida mínima;

A partir do extrato que obteve melhores resultados nas atividades antioxidante preliminar e anti-*H. pylori*:

- Realizar a semi-purificação obtendo diferentes frações;
- Determinar o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos totais nas frações após a semi-purificação;
- Avaliar a atividade antioxidante preliminar, frente a inibição dos radicais sintéticos DPPH e ABTS, após o fracionamento do extrato;
- Avaliar a atividade anti-*H. pylori* e de inibição da enzima urease e determinar a concentração inibitória mínima e sub-inibitória e a concentração bactericida mínima das frações obtidas;
- Avaliar a morfologia celular do *H. pylori* após a exposição aos extratos e frações de *B. trimera* que alcançaram concentração inibitória mínima e sub-inibitória;
- Avaliar a atividade de inibição de oxidantes biológicos do extrato e de suas frações, frente a: inibição do radical hidroxil, inibição do ácido hipocloroso,

inibição do peróxido de hidrogênio, inibição do ânion superóxido e inibição do óxido nítrico.

### 3 METODOLOGIA

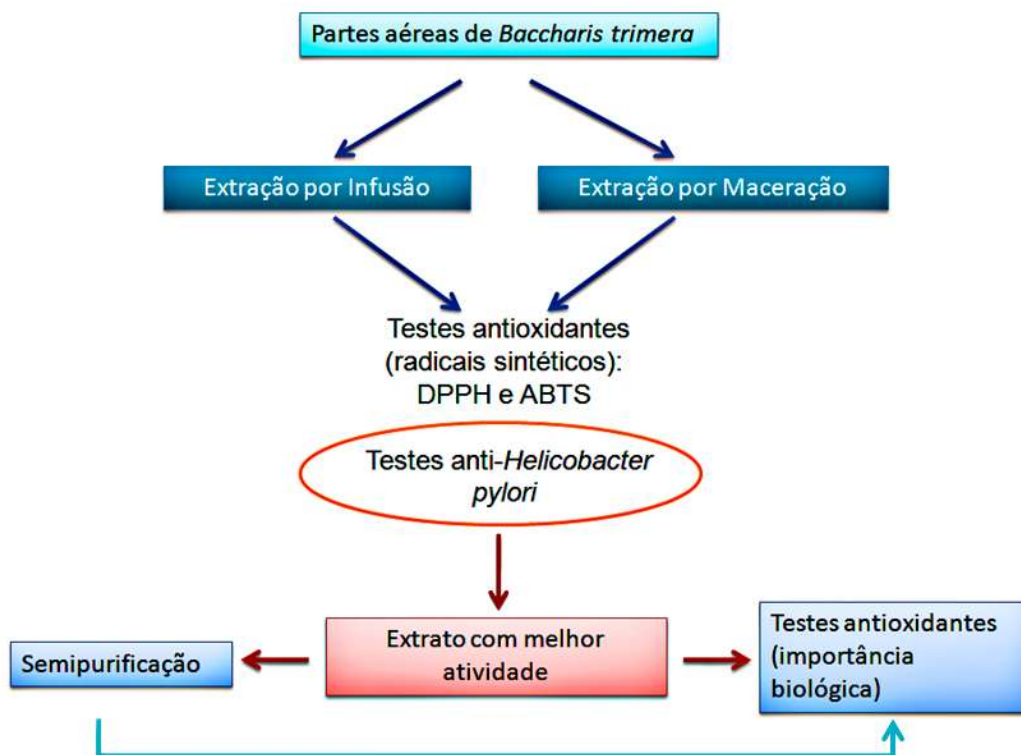
#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado no experimento foram as partes aéreas de *B. trimera*, fornecido pela empresa VELOMED®, situada em LONDRINA - PR, na forma de droga vegetal, produzido de acordo com as normas da ANVISA descritas na RDC nº26/2014 (BRASIL, 2014).

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os extratos foram obtidos através das técnicas de maceração e infusão, preparados a 10% (p/v). Utilizando o método da maceração, foram obtidos dois extratos, o Extrato Hidroalcoólico (EH) utilizando etanol 70% e o Extrato Etanólico (EE) utilizando etanol PA. Os extratos obtidos foram filtrados em gaze, algodão e papel filtro, e submetido à evaporação a 50°C sob pressão reduzida em rotaevaporador. Para o EH, após a rotaevaporação foi realizado a liofilização em equipamento LIOTOP, L101 (São Paulo - BRASIL). O terceiro extrato foi obtido por infusão, obtendo-se o Extrato Aquoso (EAq). O EAq foi filtrado em papel de filtro e em seguida liofilizado também em equipamento LIOTOP, L101 (São Paulo - BRASIL). Ambos os extratos foram conservados em baixa temperatura (-20 °C) até sua utilização nos ensaios biológicos e nos estudos químicos subsequentes. O extrato que apresentou os melhores resultados na avaliação anti-*H.pylori* e antioxidante foi semi-purificado, através de fracionamento com solventes de diferentes polaridades. De maneira resumida o desenvolvimento do trabalho pode ser visualizado na Figura 5.

O fracionamento foi realizado usando metodologia descrita por Jamal (2002), usando 15g do extrato bruto. Foram utilizados como solventes, hexano, acetonitrila/clorofórmio e água nas seguintes proporções: 2 (hexano): 1 (clorofórmio): 3,4 (acetonitrila): 1 (água), obtendo as frações, hexânica (FHx), acetonitrila/clorofórmio (FAC) e aquosa (FAq), respectivamente.



**Figura 5** - Resumo dos procedimentos realizados a partir da obtenção dos extratos e frações de *B. trimera*.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Para caracterização fitoquímica dos extratos e frações foram realizados testes clássicos de identificação, conforme descrito na literatura (FALKENBERG et al., 2003). Foram avaliados a presença dos seguintes compostos: flavonoides, saponinas, cumarinas, glicosídeos cardiotônicos, antraquinonas, taninos, alcalóides, polifenóis, triterpenos e esteróides. Para cada tipo de metabólito foram realizadas reações específicas, que indicam a presença destes a partir de algumas características como, por exemplo, alteração ou formação de cor, espuma, fluorescência ou precipitado.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS TOTAIS

Para a determinação do conteúdo de polifenóis totais (CPT) foram utilizadas as metodologias de Neves, Alencar e Carpes (2009) e Singleton e Jr. (1965), com adaptações. Na microplaca, foram adicionados 125  $\mu$ L do reagente de Folin Ciocalteu diluídos a 10% v/v em água destilada e 25  $\mu$ L da solução mãe da amostra (1 mg/mL diluída 1:3 em água destilada, uma parte da amostra para duas partes de água). A mistura foi deixada em repouso por 5 min. Após esse período foram adicionados 100  $\mu$ L de carbonato de sódio a 4%. A microplaca foi deixada em repouso ao abrigo da luz por aproximadamente 2h. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 750 nm em leitora de absorbância em microplaca iMark®, BioRad (Washington, USA). Foi utilizado o ácido gálico como padrão, e o resultado foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mgEAG/g).

Para a quantificação de taninos totais (TT) foram usadas as metodologias descritas por Costa et al. (2011) e Dimech et al. (2013), com adaptações. A solução mãe inicial (1 mg/mL), foi diluída na mesma proporção também indicada inicialmente (1:3). Nesta solução foram adicionados 100 mg de caseína. Após a adição de caseína, a solução foi colocada sob agitação por 1 hora, e em seguida, procedeu-se a filtragem em papel de filtro. A amostra filtrada é o conteúdo de polifenóis não adsorvidos (CPNA). Para determinar CPNA, foi realizado o mesmo método usado para quantificar CPT. A diferença entre CPT e CPNA será o teor de taninos totais (TT). Ácido gálico foi usado para realizar a curva de calibração, e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mgEAG/g).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do conteúdo de flavonoides totais (CFT) foi feita de acordo com Perdigão (2012). 25 mg da amostra foi diluída com 15 mL de metanol, e completou-se o volume para 50 mL com metanol em um balão volumétrico. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 1 mL, que foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se 1 mL de metanol, 0,6 mL de ácido acético

glacial, 10 mL de solução de piridina e água (1:4), 2,5 mL de solução a 6,5% de cloreto de alumínio em metanol, e completou-se o volume com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Instrutherm, UV-2000A (São Paulo, BRASIL) a 420 nm. Foi utilizado rutina como padrão externo, e o resultado foi expresso em miligramas de equivalente de rutina por grama de amostra (mgERT/g).

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*H. PYLORI*

#### 3.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

##### 3.6.1.1 Antimicrobianos padrões

Amoxicilina (SIGMA cod. A8523) e metronidazol (SIGMA cod. M3761) foram solubilizados em água estéril para preparação de soluções a 5 mg/mL. A partir dessas soluções, foram preparadas as concentrações empregadas nos ensaios de atividade antimicrobiana.

##### 3.6.1.2 Extratos

Para realização da atividade anti-*H. pylori* os extratos EE e EH, bem como as frações, FAC, FAq e FHx foram solubilizados em DMSO. O extrato EAq foi solubilizado em água estéril.

Para as amostras diluídas em DMSO foi empregada a concentração de 40 mg/mL, e para o EAq foi empregada a concentração de 10 mg/mL. Essas amostras foram mantidas à -20°C e ao abrigo da luz. As amostras diluídas em DMSO foram preparadas em concentração maior para minimizar as possíveis interferências no ensaio. Dessa forma, a quantidade de DMSO (v/v) na maior concentração testada, foi de 2,56%, não causando interferências no ensaio, de acordo com controle realizado no laboratório.

### 3.6.1.3 Microrganismo

*H. pylori* (cepa ATCC 43504), amoxicilina sensível e metronidazol resistente, foi semeado em placas contendo Agar Columbia, suplementado com 5% de sangue de carneiro, incubadas por 72 horas a 36° - 37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>.

### 3.6.1.4 Procedimento

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a norma CLSI (M7-A6, 2003) com adaptações. A cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI), suplementado com 10% de soro fetal bovino, com diversas concentrações dos extratos obtidos por diluição seriada 1:2 (1024 µg/mL - 32 µg/mL), e o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (contendo cerca de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bactérias/mL). A microplaca foi submetida à leitura espectrofotométrica em 620 nm. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em aparelho leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA). Após a leitura, a microplaca foi incubada a temperatura de 36°C-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e nova leitura foi realizada para determinação da CIM. Os testes foram realizados em triplicata, acompanhados de crescimento controle e repetidos no mínimo 3 vezes. A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração do extrato capaz de induzir um brusco declínio no valor da absorbância, inibindo 90% do crescimento bacteriano, o qual foi mantido nas concentrações seguintes. Também foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM). A CBM é definida como a menor concentração do extrato que inibiu a formação de colônias em placas de Agar Columbia. Neste ensaio a amostra correspondente ao poço da microplaca sem crescimento aparente em BHI foi semeada em placa de Agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% (incubada a 37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, por 72h).



### 3.6.2 Análise morfológica da bactéria *H. pylori*

A análise morfológica da bactéria *H. pylori* após exposição a CIM e sub-CIM foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a fim de verificar possíveis alterações na célula bacteriana. A metodologia foi adaptada de Chakraborti et al., (2013), Claverie-martin, Diaz-torres e Geoghegan (1988) e Fischer et al., (2013). Foram analisadas duas amostras, o EH e a FAC, e um controle negativo (ausência EH e/ou FAC). Sendo que, para cada amostra foi analisada a CIM e a sub-CIM. No preparo das amostras, o meio de cultura contendo a bactéria, seja sem exposição ao extrato/fração (controle negativo) ou após a exposição ao extrato/fração, foi aliquotado e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 1 mL do tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2, com posterior centrifugação. O *pellet* celular foi recolhido e adicionado a ele 200 µL do tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Uma alíquota foi colocada no centro da lamínula e após secagem o material foi fixado com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 30 minutos. A amostra obtida foi desidratada gradualmente com uma série de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%) e após secagem o material foi metalizado e submetido a leitura em microscópio eletrônico de varredura JEOL®, JSM-6610LV (Tóquio, JAPÃO), com uma tensão de aceleração de 10 kV.

### 3.6.3 Ensaio de inibição da enzima Urease

A atividade de inibição da urease foi determinada pela produção de amônia catalisada pela enzima de acordo com o método descrito por Weatherburn (1967). A mistura reacional em microplaca continha 25 µL de urease 4 UI (Sigma Jack Bean urease tipo III) e 25 µL da amostra em diferentes concentrações (32 µg/mL - 1024 µg/mL) e foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados, 25 µL de vermelho de fenol (0,02%) e 200 µL de uréia (50 mM) em tampão fosfato 100 mM (pH 6,8). A absorbância da mistura reacional foi lida em 540 nm em leitora de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA) após 20 minutos. Como padrão de inibição foi utilizado o ácido bórico.

### 3.7 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Os ensaios antioxidantes foram realizados para verificar a capacidade das amostras de bloquear a ação de espécies radicalares e não-radicalares. Os ensaios com os radicais sintéticos foram realizados com todas as amostras, extratos e frações. No entanto, os ensaios com oxidantes de importância biológica, foram realizados somente com o extrato que apresentou o melhor resultado na triagem antioxidante/anti-*H. pylori* e com suas frações. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e repetidos no mínimo três vezes. Nos testes, foi utilizado o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) como controle antioxidante. Para os ensaios antioxidantes a concentração empregada na solução mãe foi de 10 mg/mL, e os extratos/frações avaliados foram solubilizados em água, etanol, etanol:água e/ou DMSO (apenas para a fração hexânica). Para o TROLOX também foi empregado uma solução mãe de 10 mg/mL diluída em etanol.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição  $\pm$  desvio padrão da formação da espécie reativa e na forma de concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>)  $\pm$  desvio padrão, que é a concentração que inibe 50% dos oxidantes em solução. Para obter o percentual de inibição da amostra em cada teste antioxidante foi empregada a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$$

#### 3.7.1 Ensaio de captura do radical ABTS•+

A atividade antioxidante frente o radical ABTS•+ [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi determinada utilizando o método de RE et al. (1999), modificado. O ABTS•+ é um radical catiônico que pode ser gerado por reação química, eletroquímica ou enzimática a partir de uma solução de ABTS. Quando o ABTS é oxidado pelo persulfato de potássio, ocorre a formação do ABTS•+. A atividade antioxidante dos extratos pode ser mensurada quantitativamente pela redução da absorbância, devido o ABTS•+ receber um elétron de um agente antioxidante para se estabilizar. Inicialmente uma mistura aquosa de ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup>) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L<sup>-1</sup>) foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas. A solução formada de

ABTS•+ foi diluída em etanol até obtenção de uma absorbância de 0,7 a 734 nm. O ensaio foi realizado com 1000 µL da solução de ABTS•+ para 10 µL de cada concentração de extrato (3,125 a 100 µg/mL). Após 10 minutos, aliquotas de 200 µL referentes a cada triplicata do teste, foram transferidas para microplacas de 96 poços e lidas em leitora de absorbância em microplaca iMark®, BioRad (Washington, USA) em 750 nm.

### **3.7.2 Ensaio de captura do radical DPPH**

O ensaio utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) é um teste espectrofotométrico que permite fazer uma avaliação indireta da capacidade antioxidante da substância em análise. O método empregado foi baseado, com adaptações, no método descrito por Fenglin et al., (2004). O DPPH apresenta coloração violeta, tendo assim uma absorção em 540 nm, quando se encontra reduzido torna-se amarelo não sendo absorvido neste comprimento de onda. Esta redução é devida à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim um radical estável, o qual está associado à propriedade antioxidante. Neste ensaio espectrofotométrico utiliza-se uma solução de DPPH a 0,004% em etanol. Em microplacas foram adicionados 100 µL de amostra em diversas concentrações (3,125 a 100 µg/mL) e 200 µL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias foram determinadas a 540 nm em aparelho leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA). Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida com 200 µL da solução de DPPH adicionado de 100 µL de etanol.

### **3.7.3 Ensaio de captura do Ácido Hipocloroso (HOCl)**

Foi empregado neste ensaio o método descrito por Ching, Jong e Bast (1994), devidamente adaptado. O método da cloração baseia-se na oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) pelo HOCl formando o ácido 5-5'-ditio (2-nitrobenzóico) (DTNB). A absorbância do TNB a 415 nm diminui na presença de HOCl devido a formação do DTNB. No ensaio, 100 µL de HOCl (25 µM) foi incubado com 100 µL das amostras em concentrações variando de 3,125 a 100 µg/mL, 300 µL de tampão fosfato (50 mM) pH 6,6 e, após 5 minutos, 500 µL de TNB (50 µM). A mistura reacional foi lida a 415 nm em leitora de absorbância em microplaca iMark®, BioRad

(Washington, USA). A solução de HOCl foi preparada a partir de hipoclorito de sódio, ajustando o pH para 12 adicionando NaOH a 10%. A concentração final desejada (25  $\mu$ M) foi determinada usando o coeficiente de extinção molar. A solução de TNB (50  $\mu$ M) também foi preparada usando o coeficiente extinção molar, em uma reação de DTNB (1 mM), EDTA (5 mM) e NaBH<sub>4</sub> (20 mM), respectivamente, em um volume final de 50 mL.

### 3.7.4 Ensaio de captura do Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Neste ensaio foi empregado o método descrito por Suzumura, Yasuhara e Narita (1999) com adaptações. O radical  $O_2^{\cdot-}$  produzido, reduz o nitroblue tetrazolium (NBT) a formazan, em pH 7,4 e temperatura ambiente. As moléculas que atuam como antioxidante reagem com  $O_2^{\cdot-}$  inibindo a produção do formazan. Em microplaca de 24 poços, foram adicionados 100  $\mu$ L de amostra, variando nas concentrações de 3,125 a 100  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ L de metassulfato de fenazina (PMS) (5  $\mu$ M), 100  $\mu$ L de NBT (45  $\mu$ M), 750  $\mu$ L do tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, pH 7,4. Depois de dois minutos foi adicionado 25  $\mu$ L de NADH (0,125 mM). A leitura foi realizada após 10 minutos de incubação em 540 nm, utilizando aparelho leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA).

### 3.7.5 Ensaio de captura do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

Neste ensaio o  $H_2O_2$  é quebrado pela peroxidase gerando um intermediário reativo que oxida o vermelho de fenol a um composto amarelo que em pH básico se torna vermelho púrpura, podendo ser quantificado em 620 nm. Foi seguido o método descrito por Pick & Keisari, (1980), com adaptações. A diminuição da absorbância deste sistema indica a neutralização do  $H_2O_2$  pelas substâncias em estudo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata em um volume final de 200  $\mu$ L da mistura de reação contendo 20  $\mu$ L de diferentes concentrações dos extratos (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu$ g/mL), 40  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (2 mM), 16  $\mu$ L da solução de NaCl (140 mM), vermelho de fenol (0,1 mg/mL) e dextrose (5,5 mM), em tampão fosfato pH 7. Adicionou-se também 104  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7 e por último a enzima peroxidase 20  $\mu$ L (8,5 U/mL). Esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e a reação foi terminada pela adição de 20  $\mu$ L de NaOH 1N. O complexo

púrpura do vermelho de fenol oxidado foi quantificado em 620 nm em aparelho leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA).

### **3.7.6 Ensaio de captura do radical Hidroxil (HO<sup>•</sup>)**

O ensaio da deoxirribose consiste na degradação do açúcar deoxirribose quando exposto ao HO<sup>•</sup>, formando malonaldeído (MDA) que pode ser detectado pela habilidade de reagir com ácido tiobarbitúrico formando um cromógeno rosa. Para a realização deste ensaio foi utilizado a metodologia descrita por Halliwell, Gutteridge e Aruoma (1987), com adaptações. A mistura reacional continha: 200 µL das amostras em concentrações variando de 3,125 a 100 µg/mL, 100 µL de FeCl<sub>3</sub> (50 µM), 100 µL de EDTA (100 µM), 100 µL de ascorbato (100 µM), 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), 100 µL de deoxirribose (2,8 mM), 300 µL de tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH 10 mM pH 7,4 (volume final de 1 mL). A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação foi adicionado 500 µL de ácido tiobarbitúrico 1%, preparado em NaOH 50 mM, e 500 µL de ácido tricloroacético 2,8%, com nova incubação em banho-maria por 5 minutos a 100°C. A inibição do radical HO<sup>•</sup> foi determinada a 540 nm em aparelho leitor de absorvância em microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA) pelo não desenvolvimento do cromógeno rosa.

### **3.7.7 Ensaio de captura do Óxido Nítrico (NO<sup>•</sup>)**

Para verificar a capacidade de inibição de NO<sup>•</sup> pelas amostras testadas foi realizada análise com base nas metodologias apresentadas por Marcocci et al., (1994) e Sreejayan e Rao, (1997) com adaptações. O ensaio se baseia na capacidade de dada amostra em seqüestrar o radical NO<sup>•</sup> liberado espontaneamente no meio aquoso, em pH fisiológico, somado a incidência de luz, a partir do nitroprussiato de sódio (NPS), impedindo com isso a formação do cromóforo rosa detectado por espectrofotometria, após a adição do reagente de Griess. O reagente de Griess indica a quantidade de nitrito formado, já que este método indica a formação de NO<sup>•</sup> indiretamente a partir do nitrito. O NO<sup>•</sup> liberado a partir do NPS reage com o oxigênio molecular formando nitrito que em contato com o reagente de Griess torna a mistura reacional rosa.

Inicialmente foi realizado o preparo do NPS 1,25 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Na reação 50  $\mu$ L do NPS (1,25 mM) foi incubado com 50  $\mu$ L da amostra a ser testada em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 100  $\mu$ L de reagente de Griess (1% p/v de sulfanilamida, 0,1% p/v de naftiletilenodiamina e 2,5% v/v de ácido orto-fosfórico) e a mistura reacional foi lida em 540 nm em aparelho leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA). O controle negativo foi realizado adicionando todos os reagentes menos o NPS, sendo este substituído por tampão.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a capacidade inibitória dos extratos e frações de *B. trimera*, tanto frente aos oxidantes quanto à bactéria *H. pylori*, e comparar os resultados obtidos com os padrões de modo com que se verifique a relevância estatística, foi empregado o método ANOVA de duas vias. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Como teste *post-hoc* foi empregado teste de Tukey. Para verificar a correlação existente entre polifenóis, taninos e flavonoides totais com os ensaios antioxidantes usamos a correlação de Pearson, considerando  $r = 0,10$  até  $0,30$  (fraco);  $r = 0,40$  até  $0,6$  (moderado);  $r = 0,70$  até  $1$  (forte) (FILHO; JÚNIOR, 2009). Para o cálculo de  $CE_{50}$ , onde foi possível fora empregado o teste de regressão linear, nos outros casos foi empregado a regressão não linear. Os testes estatísticos foram realizados no GraphPad Prism 6.0, excetuando a regressão linear no qual a mesma foi calculada utilizando o programa BioEstat 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PREPARO DOS EXTRATOS E FRACIONAMENTO

Os extratos preparados por maceração, EH e EE, obtiveram rendimentos de 10,83% e 8,14%, respectivamente. Enquanto, o EAq obteve rendimento de 7,42%.

O extrato com melhor desempenho antioxidante e anti-*H. pylori* foi submetido a semi-purificação através de fracionamento. Para isso foi realizado uma partição trifásica, usando como solventes, hexano, acetonitrila/clorofórmio e água. Nesse caso foi usado o EH, o qual obteve os melhores resultados preliminares. O rendimento total após o fracionamento foi de 80,6%, sendo que deste valor, foram obtidos 59,4% de FAq, 19,4% de FAC e 1,8% de FHx.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos na caracterização fitoquímica dos extratos e frações, respectivamente. Na tabela 1 observamos que no EAq foi detectado positividade para flavonóides, saponinas, polifenóis, cumarinas e taninos, já o EH mostrou diferença frente ao EAq apenas quanto a ausência de saponinas e a presença de triterpenos/esteróides. Para o EE foi detectado positividade para flavonoides, polifenóis, cumarinas, esteróides/triterpenos e taninos.

**Tabela 1** - Caracterização fitoquímica preliminar dos extratos aquoso (EAq), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE) de *B. trimera*.

Testes de identificação	Extrato Aquoso (EAq)	Extrato Hidroalcoólico (EH)	Extrato Etanólico (EE)
Flavonoides	+	+	+
Saponinas	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Polifenóis	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Esteróides	-	+	+
Triterpenos	-	+	+
Taninos	+	+	+
Alcalóides	-	-	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-	-	-

A caracterização fitoquímica após o fracionamento do extrato EH está apresentada na tabela 2. Na FAq detectou-se positividade para flavonoides, polifenóis, cumarinas, triterpenos/esteróides e taninos. A FAC teve o mesmo perfil, enquanto a FHx teve resultado positivo para polifenóis, cumarinas e triterpenos/esteróides.



**Tabela 2** - Caracterização fitoquímica preliminar das frações aquosa (FAq), acetoneitrila/clorofórmio (FAC) e hexânica (FHx), obtidas a partir do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera*.

Testes de identificação	Fração Aquosa (FAq)	Fração Acetonitrila/Clorofórmio (FAC)	Fração Hexânica (FHx)
Flavonoides	+	+	-
Saponinas	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Polifenóis	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Esteróides	+	+	+
Triterpenos	+	+	+
Taninos	+	+	-
Alcalóides	-	-	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-	-	-

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Na determinação do CPT, os resultados mostraram que os extratos EAq, EH e EE apresentaram, 166,3, 177,3 e 100,0 mgEAG/g, respectivamente. Enquanto que, ao analisar as frações do EH, obteve-se o resultado de 162,2, 138,1, 16,1 mgEAG/g para a FAq, FAC e FHx, respectivamente.

Para a quantificação de TT, os resultados mostraram que os extratos EAq, EH e EE apresentaram 88,6, 80,6, 57,7 mgEAG/g. Já ao analisar as frações, os resultados indicaram que FAq e FAC, apresentaram 102,4 e 45,2 mgEAG/g, respectivamente.

Também foi realizada a quantificação do CFT. Para o EAq o conteúdo de flavonoides totais foi de 69,1 mgERT/g. Para o EH e EE foram obtidos 87,4 e 45,4 mgERT/g, respectivamente. Para a FAq o resultado foi de 56,4 e para a FAC, 95,5 mgERT/g.

Devido a ausência de flavonoides e taninos na triagem fitoquímica para a FHx, o doseamento destes metabólitos para esta fração, não foi realizado. Todos os resultados podem ser visualizados detalhadamente na tabela 3.

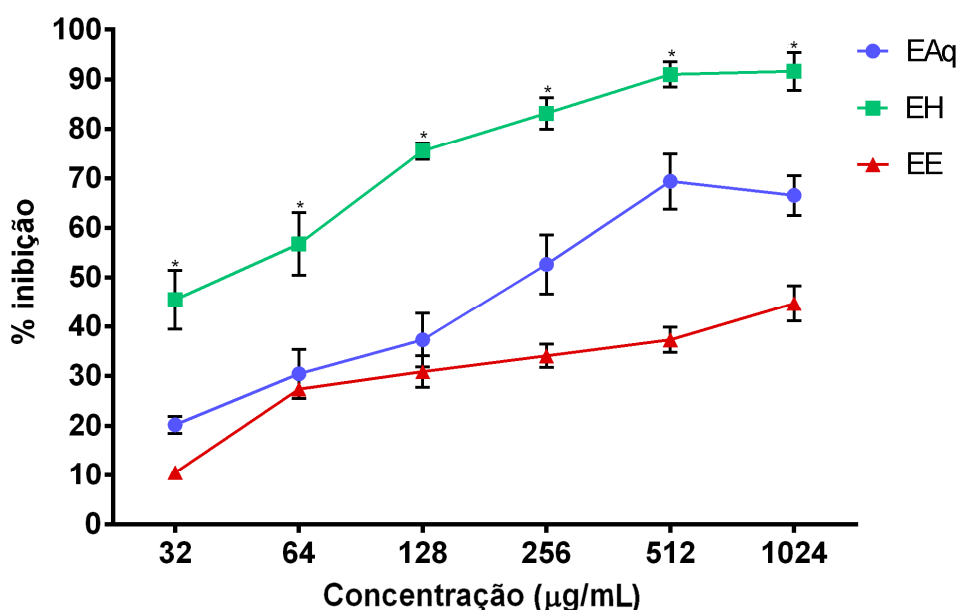
**Tabela 3** - Valores da determinação do conteúdo de flavonoides, taninos e polifenóis totais do Extrato aquoso (EAq), Extrato etanólico (EE), Extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e das frações Aquosa (FAq), Acetonitrila/clorofórmio (FAC) e Hexânica (FHx) do EH. Resultados expressos em média (mgERT/g ou mgEAG/g)  $\pm$  desvio padrão.

Metabólitos Secundários	EAq	EE	EH	FAq	FAC	FHx
Flavonoides (mgERT/g)	69,1 $\pm$ 6,5	45,4 $\pm$ 7,8	87,4 $\pm$ 2	56,4 $\pm$ 5,9	95,5 $\pm$ 3,8	-
Taninos (mgEAG/g)	88,6 $\pm$ 6,4	57,7 $\pm$ 1,3	80,6 $\pm$ 3,3	102,4 $\pm$ 0,2	45,2 $\pm$ 1,7	-
Polifenóis (mgEAG/g)	166,3 $\pm$ 12,2	100,0 $\pm$ 12,4	177,3 $\pm$ 11,5	162,2,0 $\pm$ 15,3	138,1 $\pm$ 0,2	16.15 $\pm$ 0,67

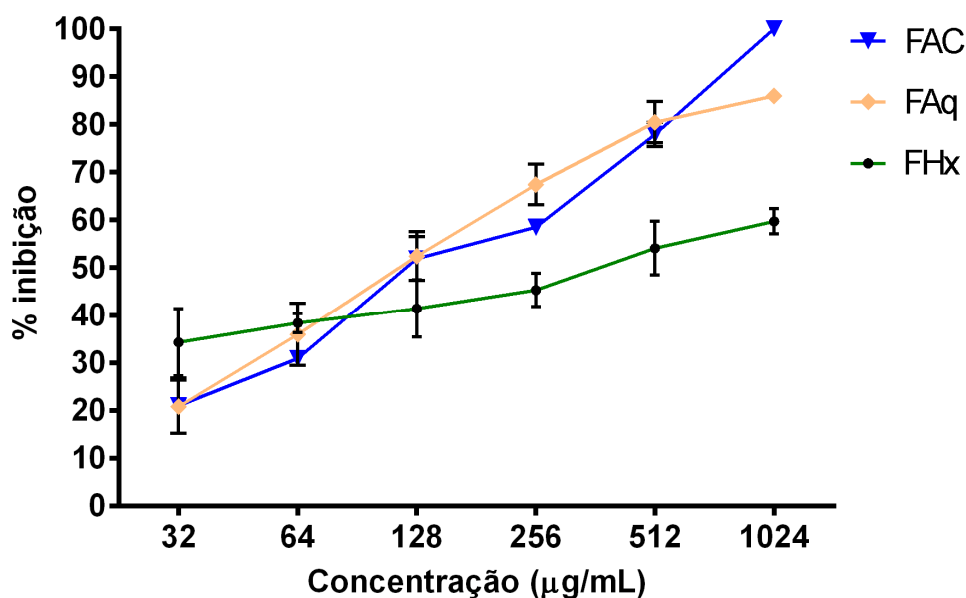
#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*H. pylori*

A atividade anti-*H. pylori* do EAq, EE e EH de *B. trimera* está apresentada na figura 6. Os resultados demonstram que EE e EAq não apresentaram CIM, todavia o EH apresentou CIM em 512 µg/mL. Comparando o EE e EAq com o EH, houve diferença significativa ( $p<0,05$ ), com desempenho superior obtido pelo EH. Este foi um dos motivos para que o extrato EH fosse fracionado.

Dentre as frações do EH testadas, foi observada CIM na FAC de 1024 µg/mL e para as frações FAq e FHx a CIM foi maior que 1024 µg/mL. Os resultados em porcentagem de inibição com desvio padrão podem ser vistos na figura 7.



**Figura 6** - Relação dose-resposta do crescimento de *H. pylori* na presença dos extratos Aquoso (EAq), Hidroalcolico (EH) e Etanólico (EE) de *B. trimera*. Resultados expressos em percentual de inibição  $\pm$  desvio padrão. \* Diferenças significativas em relação ao EH,  $p<0,05$ .



**Figura 7** - Relação dose-resposta do crescimento de *H. pylori* na presença das frações, Aquosa (FAq), Acetonitrila/clorofórmio (FAC) e hexânica (FHx) do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera*. Resultados expressos em percentual de inibição  $\pm$  desvio padrão.

Na tabela 4 podem ser vistos os valores de CIM e CBM do EH, da FAC e dos controles antimicrobianos. Com relação aos controles antimicrobianos, a amoxicilina apresentou CIM de 0,5 µg/mL e CBM de 1µg/mL, já o metronidazol não apresentou CIM nem CBM nas concentrações testadas, confirmando a resistência da bactéria a esse antibiótico.

Em relação a CBM, os resultados mostram que a FAC apresentou capacidade bactericida na concentração de 1024 µg/mL frente a bactéria *H. pylori*. Os resultados da avaliação da CBM de todas as amostras testadas podem ser visualizadas no Apêndice 1 deste trabalho.

**Tabela 4** - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do Extrato hidroalcoólico (EH) e Fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC) de *B. trimera*, bem como controles antimicrobianos (Amoxicilina e Metronidazol).

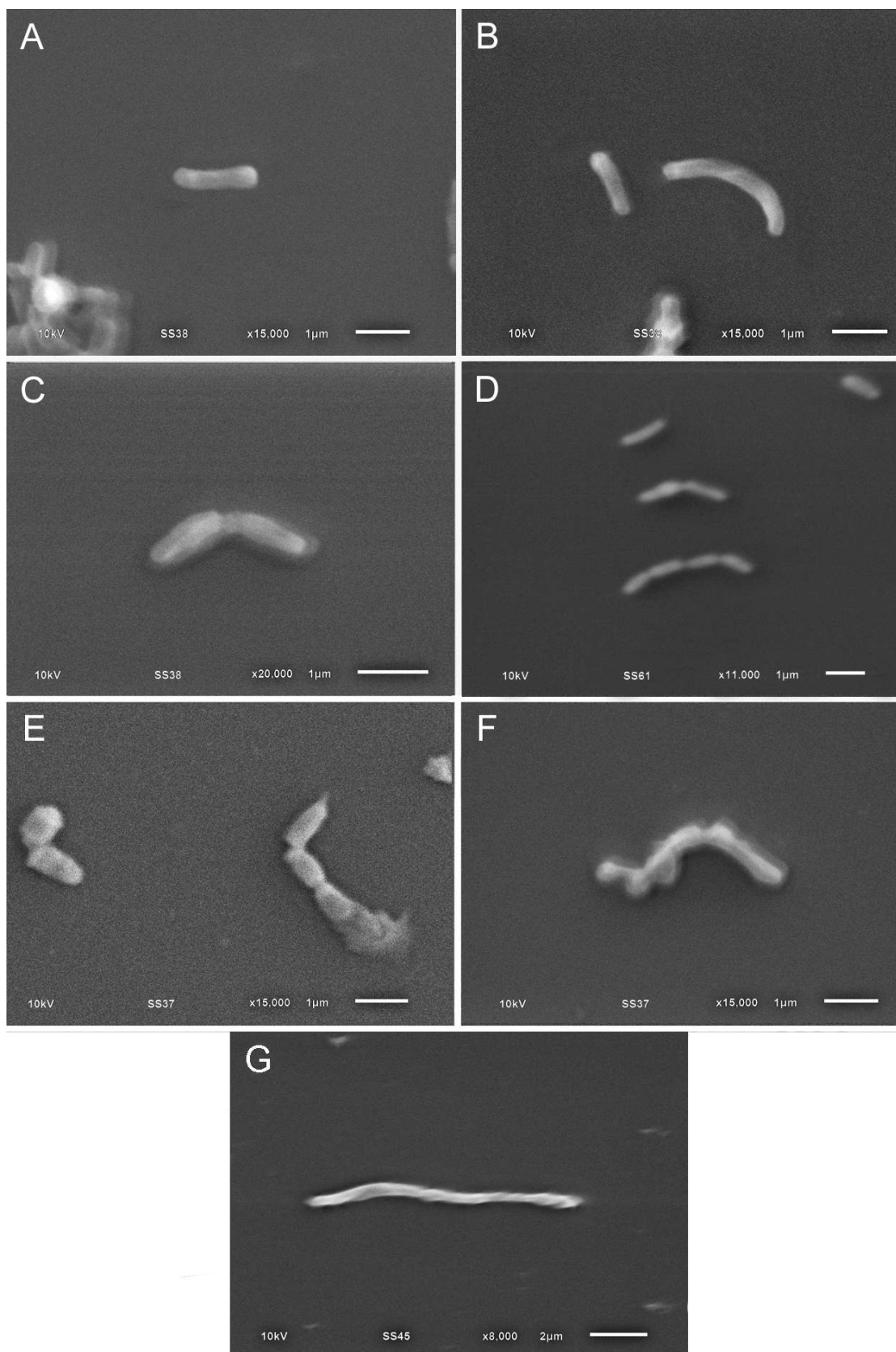
	EH	FAC	Amoxicilina	Metronidazol
<b>CIM</b>	512 µg/mL	1024 µg/mL	0,5 µg/mL	-
<b>CBM</b>	-	1024 µg/mL	1 µg/mL	-

Após a realização do ensaio de inibição de *H. pylori* foi obtido os valores de sub-CIM e CIM das amostras testadas. A determinação da sub-CIM é importante pelo fato de se tratar de uma concentração onde as alterações celulares estão em um processo mais inicial e ainda não refletem a morte da bactéria, facilitando a compreensão da gênese dos eventuais danos que a célula bacteriana venha a sofrer.

Para EH foi obtido os valores de 256 µg/mL e 512 µg/mL, para sub-CIM e CIM respectivamente, em relação a FAC foram verificados os valores de 512 µg/mL e 1024 µg/mL para sub-CIM e CIM, respectivamente. A partir destes resultados, realizamos a microscopia eletrônica de varredura (MEV), buscando visualizar eventuais alterações na célula bacteriana após exposição as amostras.

Os resultados podem ser visualizados na figura 8. Na figura 8A e 8B, são visualizados o controle negativo, sem tratamento com o extrato ou fração, apresentando a forma de *H. pylori* mais comumente encontrada em culturas microaerófilas. Podem ser visualizadas formas bacilares normais, com a parede bacteriana aparentemente intacta, sem alterações. Nas figuras 8C e 8D, as bactérias foram tratadas com EH nas concentrações de 256 µg/mL (sub-CIM) e 512 µg/mL (CIM), respectivamente. A microscopia mostra que houve alteração estrutural comparada ao controle, principalmente com formação de bolhas na parede bacteriana. Outro aspecto a ser registrado é a aparente dificuldade que as células bacterianas demonstraram na presença deste extrato, tanto no sub-CIM quanto no CIM, de se replicar, com a septação celular aparentemente comprometida. Os

resultados após incubação com a FAC estão apresentados nas figuras 8E, 8F e 8G. Na figura 8E, foi utilizada a concentração de 512 µg/mL (sub-CIM) e nas figuras 8F e 8G, 1024 µg/mL (CIM). Também foi verificada alterações morfológicas quando comparado ao controle. Contudo, as alterações foram mais intensas, incluindo lise celular e estreitamento da bactéria, diferenças importantes quando comparadas ao controle. Outro achado relevante foi a presença de células filamentosas, na concentração de 1024 µg/mL da FAC, indicando uma forma bacteriana não comum (Figura 8G). Também foi possível observar, que aparentemente as células expostas a FAC e ao EH, estão maiores e mais longas, quando comparadas ao controle, corroborando com a hipótese de dificuldade da septação bacteriana.

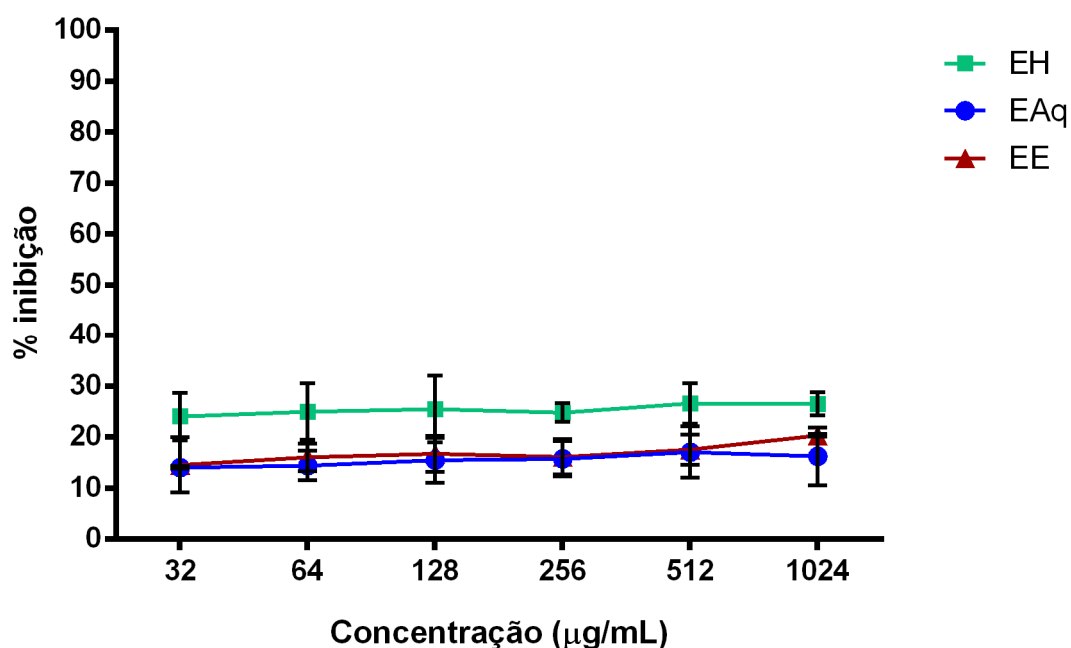


**Figura 8** - Microscopia eletrônica de varredura da bactéria *H. pylori* na ausência das amostras (figuras A e B) e após exposição a EH (figuras C e D) e FAC (figuras E, F e G) de *B. trimera*, com aumento variando de 8.000 a 20.000x.

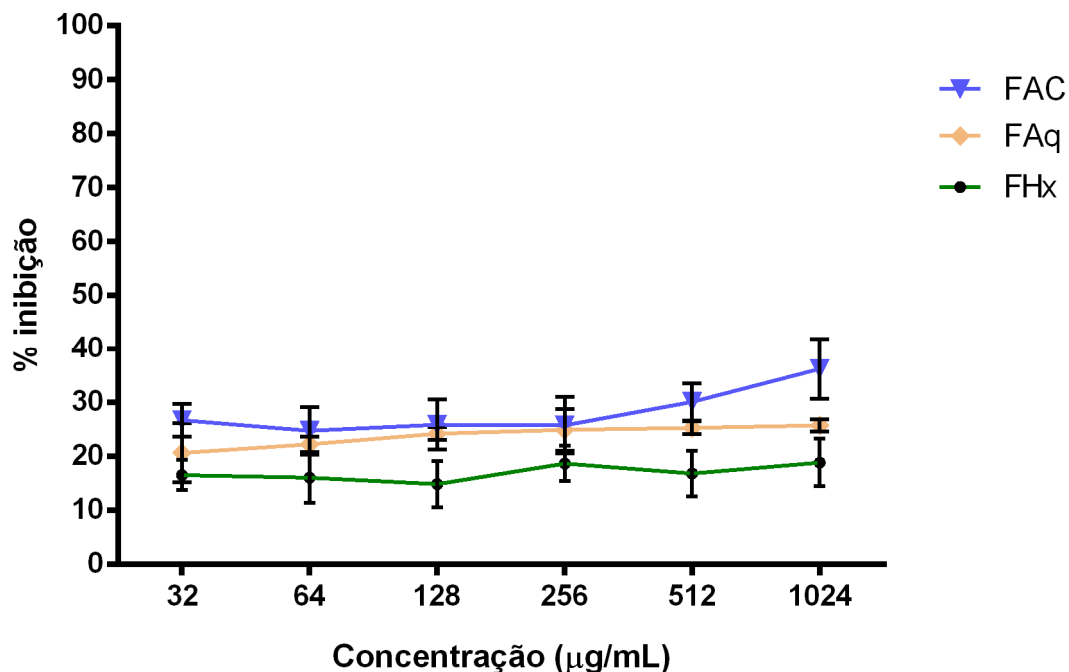


#### 4.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA UREASE

Para avaliar diferentes mecanismos de atividade anti-*H.pylori*, foi realizado o ensaio de inibição da enzima urease. Este ensaio demonstrou que as amostras foram incapazes de inibir 50% da atividade nas concentrações testadas. Apenas a FAC apresentou 36,24%  $\pm$  5,59 de inibição na maior concentração (1024  $\mu$ g/mL). Dentre os extratos o EH na maior concentração testada, inibiu 26,51%  $\pm$  2,30, o EAq inibiu 16,23%  $\pm$  5,69, e o EE atingiu 19,48%  $\pm$  1,67 de inibição. Os resultados referentes aos extratos são exibidos na figura 9. Ao avaliar as frações, a FAC apresentou o melhor desempenho como descrito anteriormente, já a FAq e FHx inibiram 25,76%  $\pm$  2,30 e 18,90%  $\pm$  4,40, respectivamente, na maior concentração avaliada. Os resultados pertencentes as frações são demonstrados na figura 10. O ácido bórico, substância usada como controle, inibiu 76,34% da atividade da enzima urease na concentração de 20 mM.



**Figura 9** - Relação entre a concentração e a inibição da enzima urease para o Extrato hidroalcoólico (EH), Extrato aquoso (EAq) e Extrato etanólico (EE) de *B. trimera*. Resultados expressos em percentual de inibição  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 10** - Relação entre a concentração e a inibição da enzima urease para a Fração acetonitrila/clorofórmio (FAC), Fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera*. Resultados expressos em percentual de inibição  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante preliminar, frente a radicais sintéticos, foi realizada com todas as amostras. Os ensaios de captura do HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e HO<sup>•</sup>, foram realizados com o EH, devido ao seu melhor desempenho tanto anti-*H.pylori* quanto antioxidante e com as suas frações, FAC e FAq. A fração FHx não foi avaliada em virtude dos resultados inexpressivos nos ensaios com ABTS<sup>•+</sup> e DPPH. Os resultados de CE<sub>50</sub> para todos os ensaios podem ser visualizados na tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados de  $CE_{50} \pm$  desvio padrão ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os ensaios de atividade antioxidante, analisando todas as amostras nos testes de DPPH e ABTS, e avaliando o Extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e suas frações, aquosa (FAq) e acetonitrila/clorofórmio (FAC), nos ensaios com oxidantes de importância biológica. O TROLOX foi usado como controle antioxidante.

Amostras	ABTS	DPPH	HOCl	$O_2^{\cdot -}$	$H_2O_2$	$HO^{\cdot}$	$NO^{\cdot}$
EAq	$14,88 \pm 1,16$	$17,40 \pm 0,52$	-	-	-	-	-
EE	$23,88 \pm 3,27$	$38,32 \pm 1,51$	-	-	-	-	-
EH	$9,99 \pm 1,21$	$28,43 \pm 0,80$	$17,58 \pm 2,79$	$9,52 \pm 1,48$	>100	$4,27 \pm 1,01$	$167,5 \pm 3,8$
FAq	$10,80 \pm 1,90$	$27,41 \pm 1,65$	>100	$5,85 \pm 0,86$	>100	$4,06 \pm 0,90$	$183,5 \pm 8,65$
FAC	$15,04 \pm 2,03$	$53,58 \pm 2,55$	$15,50 \pm 0,80$	$52,00 \pm 4,73$	$66,70 \pm 2,30$	$2,90 \pm 0,48$	$132,13 \pm 7,8$
FHx	>100	>100	-	-	-	-	-
TROLOX	$1,08 \pm 0,05$	$4,60 \pm 0,82$	$16,02 \pm 1,78$	$88,81 \pm 2,92$	$26,88 \pm 0,34$	$4,59 \pm 0,45$	$39,22 \pm 5,03$

Já a análise estatística empregando a correlação de Pearson confrontando os resultados de  $CE_{50}$  para cada teste e a quantificação de polifenóis, flavonoides e taninos, resultando no  $r$  de Pearson, pode ser visualizado na tabela 6.

**Tabela 6** - Valores do  $r$  de Pearson com correlação negativa significativa, em relação aos resultados de  $CE_{50}$  dos diferentes ensaios de atividade antioxidante e o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos totais.

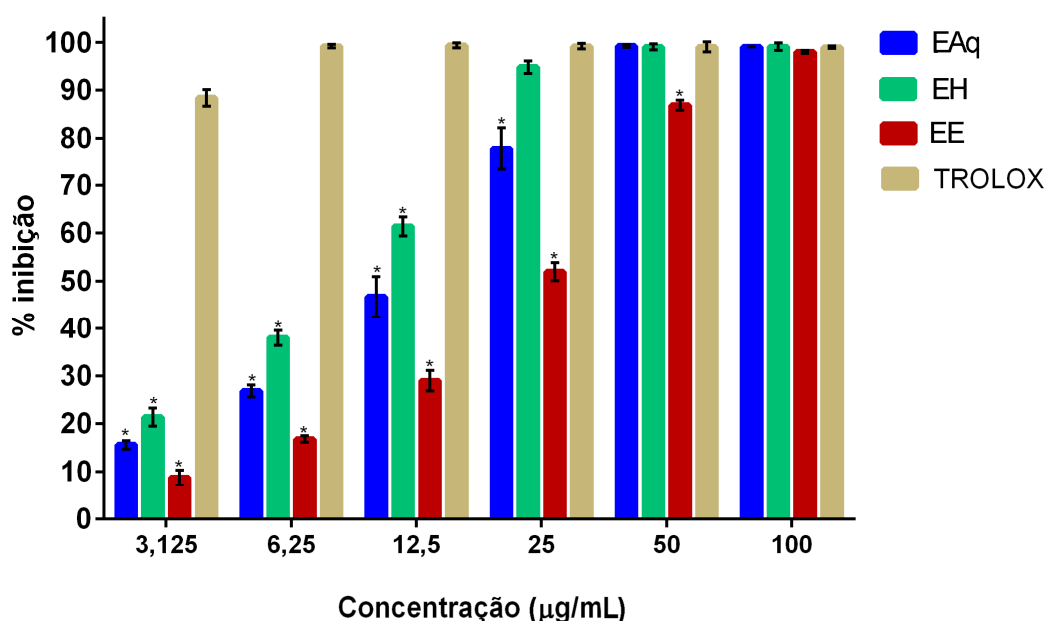
Ensaio	Correlação de Pearson ( $r$ )		
	Polifenóis	Flavonoides	Taninos
Ensaio do radical ABTS $^{\bullet+}$	-0.9102	-0.5223	-0.5706
Ensaio do radical DPPH	-0.6338	-	-0.7917
Ensaio do Ácido Hipocloroso (HOCl)	-	-0.9824	-
Ensaio do Ânion Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	-0.8917	-	-0.9473
Ensaio do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	-	-0.9458	-
Ensaio de captura do radical Hidroxil ( $HO^{\bullet}$ )	-	-	-
Ensaio radical Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )	-	-0.8301	-

#### 4.6.1 Ensaio de captura do radical ABTS $^{\bullet+}$

Após a realização deste ensaio foi observado que todos os extratos apresentaram a capacidade de neutralizar o radical ABTS $^{\bullet+}$  acima de 50% nas maiores concentrações testadas, todavia os extratos variaram em relação a concentração eficaz 50% ( $CE_{50}$ ). O EH foi o que desempenhou uma melhor atividade antioxidante frente ao radical ABTS $^{\bullet+}$  com  $CE_{50}$  de  $9,99 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$ . Enquanto, o EAq apresentou  $CE_{50}$  de  $14,88 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ , e o EE obteve  $CE_{50}$  de  $23,88 \pm 3,27 \mu\text{g/mL}$ . Neste ensaio o TROLOX apresentou  $CE_{50}$  de  $1,08 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ .

Os resultados em porcentagem de inibição referente aos extratos podem ser vistos na figura 11. Nas maiores concentrações avaliadas foram encontradas porcentagens de inibição nos valores de 99,12, 98,78 e 98,03 para EH, EAq e EE,

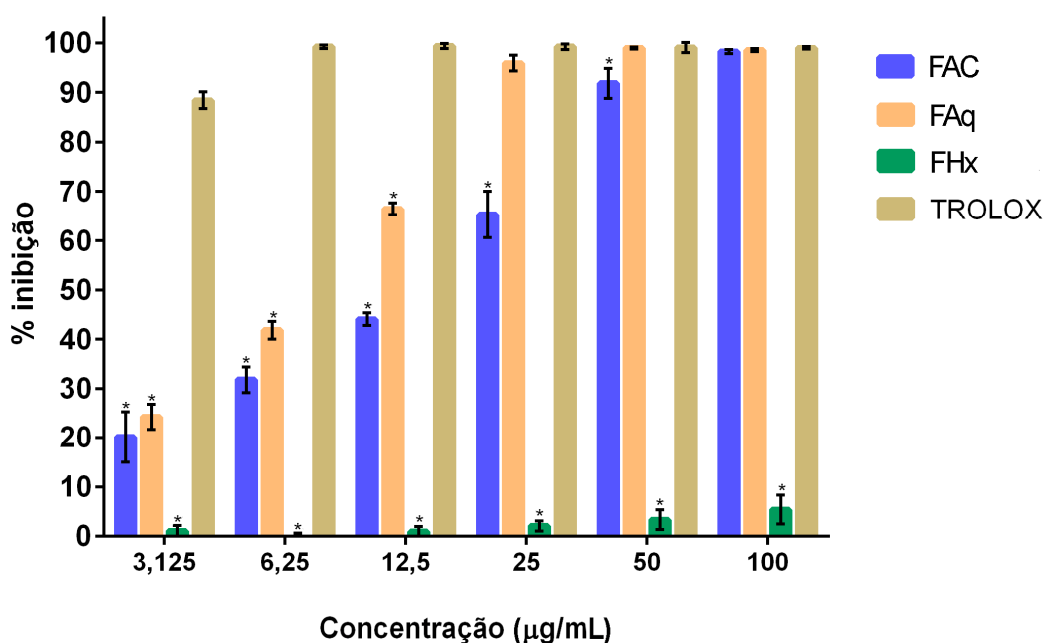
respectivamente. Na análise estatística foi verificado que nas três primeiras concentrações testadas, todos os extratos não apresentaram desempenho estatisticamente semelhante ao padrão. Contudo, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, o EH não apresentou diferença significativa frente ao TROLOX. Para o EAq não foi observado diferença significativa a partir da concentração de 50 µg/mL, ao passo que o EE apresentou semelhança estatística na concentração de 100 µg/mL ( $p>0,05$ ).



**Figura 11** - Porcentagem de inibição do extrato aquoso (EAq), Extrato hidroalcoólico (EH) e Extrato Etanólico (EE) de *B. trimera* para o teste de captura do radical ABTS•+. O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante. \*Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p<0,05$ .

Considerando a melhor atividade antioxidante e anti-*H.pylori* do EH, foram realizados ensaios com as suas frações. A realização destes ensaios mostrou que duas das três frações testadas apresentaram a capacidade de neutralizar o radical ABTS•+ acima de 50%. A FAq apresentou  $CE_{50}$  de  $10,80 \pm 1,90$  µg/mL e a FAC um  $CE_{50}$  de  $15,04 \pm 2,03$  µg/mL. O padrão antioxidante, TROLOX, apresentou  $CE_{50}$  de  $1,08 \pm 0,05$  µg/mL. A FHx não apresentou a capacidade de inibir 50% do radical nas concentrações testadas.

Os resultados em porcentagem de inibição para as frações podem ser vistos na figura 12. Nas maiores concentrações testadas foi encontrado porcentagens de inibição no valor de 98,25, 98,52 e 5,40, para FAC, FAq e FHx, respectivamente. Na análise estatística, as três primeiras concentrações testadas para todas as frações não apresentaram desempenho semelhante ao TROLOX. Mas, nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  a FAq não apresentou diferença estatística significativa em relação ao TROLOX, fato que também foi observado pela FAC na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p>0,05$ ).



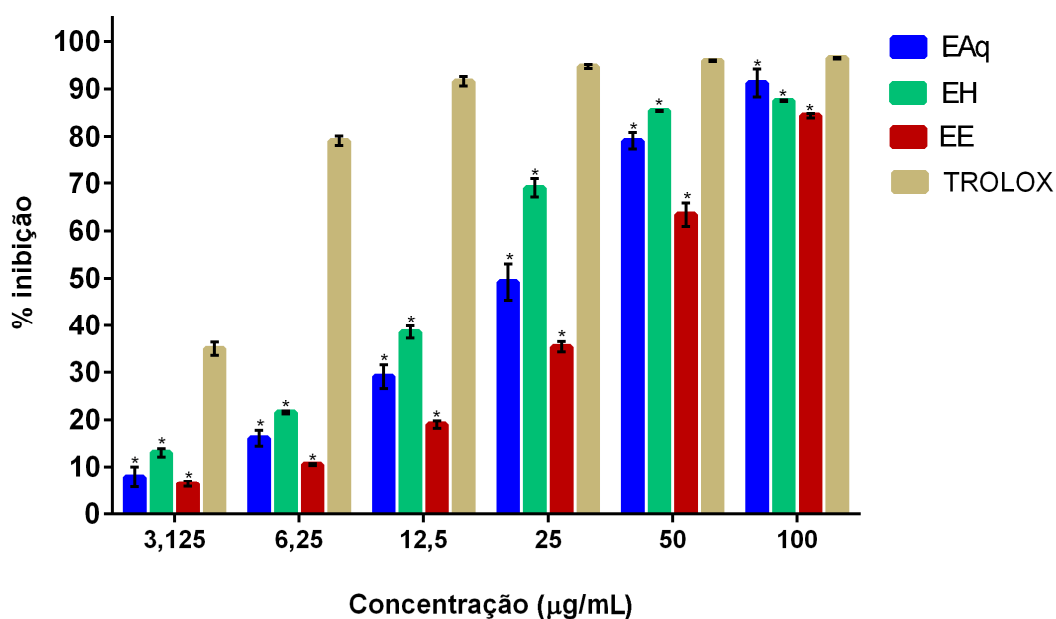
**Figura 12** - Porcentagem de inibição da fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC), fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* para o teste de captura do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante. \* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p<0,05$ .

Com relação aos extratos e frações testados para  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , foi avaliado a correlação dos seus respectivos  $\text{CE}_{50}$  frente ao conteúdo de polifenóis, taninos e flavonoides totais. Os resultados de  $\text{CE}_{50}$  quando avaliados frente ao teor de polifenóis totais mostraram forte correlação negativa ( $r = -0.9102$ ), para taninos houve moderada correlação negativa ( $r = -0.5706$ ) e para flavonoides totais, também foi verificado uma moderada correlação negativa ( $r = -0.5223$ ).

#### 4.6.2 Ensaio de captura do Radical DPPH

Após a realização dos ensaios foi observado que todos os extratos apresentaram a capacidade de neutralizar o radical DPPH acima de 50%, nas maiores concentrações testadas. O EAq apresentou  $CE_{50}$  de  $28.43 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$ , seguido do EE que obteve  $CE_{50}$  de  $38,32 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$ . O EH, novamente, foi o que desempenhou uma melhor atividade antioxidante, com  $CE_{50}$  de  $17,40 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ . O  $CE_{50}$  da substância padrão para o teste de DPPH foi de  $4,60 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ .

Os resultados em porcentagem de inibição para os extratos estão apresentados na figura 13. Nas maiores concentrações testadas foi encontrado porcentagem de inibição de 87,50, 91,21 e 84,40 para EH, EAq e EE, respectivamente. Com base nos resultados estatísticos podemos verificar que houve diferença significativa entre todos os ensaios ( $p < 0,05$ ) frente ao padrão (TROLOX).

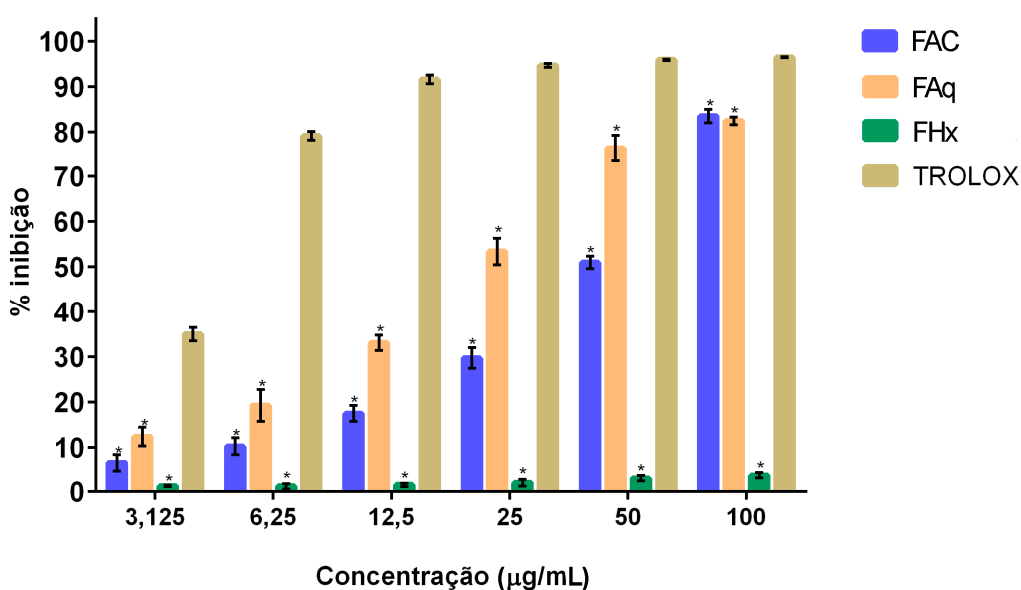


**Figura 13** - Porcentagem de inibição do extrato aquoso (EAq), Extrato hidroalcoólico (EH) e Extrato Etanólico (EE) de *B. trimera* para o teste de captura do radical DPPH. O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante. \* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

Avaliando as frações do EH, os resultados dos ensaios com DPPH demonstraram que FAq e FAC apresentaram a capacidade de neutralizar o radical acima de 50%. A FHx também não teve capacidade de inibir o radical DPPH. A FAq

apresentou um  $CE_{50}$  de  $27,41 \pm 1,65 \mu\text{g/mL}$  e a FAC de  $53,58 \pm 2,55 \mu\text{g/mL}$ . O TROLOX apresentou um  $CE_{50}$  de  $4,60 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ .

Os resultados em porcentagem de inibição referente as frações podem ser vistos na figura 14. Nas maiores concentrações testadas foi encontrado uma porcentagem de inibição de 83,49%, 82,41% e 3,62% para FAC, FAq e FHx, respectivamente. A análise referente aos extratos mostrou que nenhuma fração apresentou semelhança estatística nas concentrações testadas quando comparado ao TROLOX ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14** - Porcentagem de inibição da fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC), fração aquosa (FAq) e Fração hexânica (FHx) do Extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* para o teste de captura do radical DPPH. O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante. \* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

Quando avaliados os resultados de DPPH e comparados ao teor de polifenóis, verificamos uma moderada correlação negativa, indicada pelo  $r$  de Pearson ( $r = -0,6338$ ) e quando comparado ao teor de taninos totais foi indicado uma forte correlação negativa, demonstrada pelo  $r$  ( $r = -0,7917$ ). Para flavonoides não houve correlação.

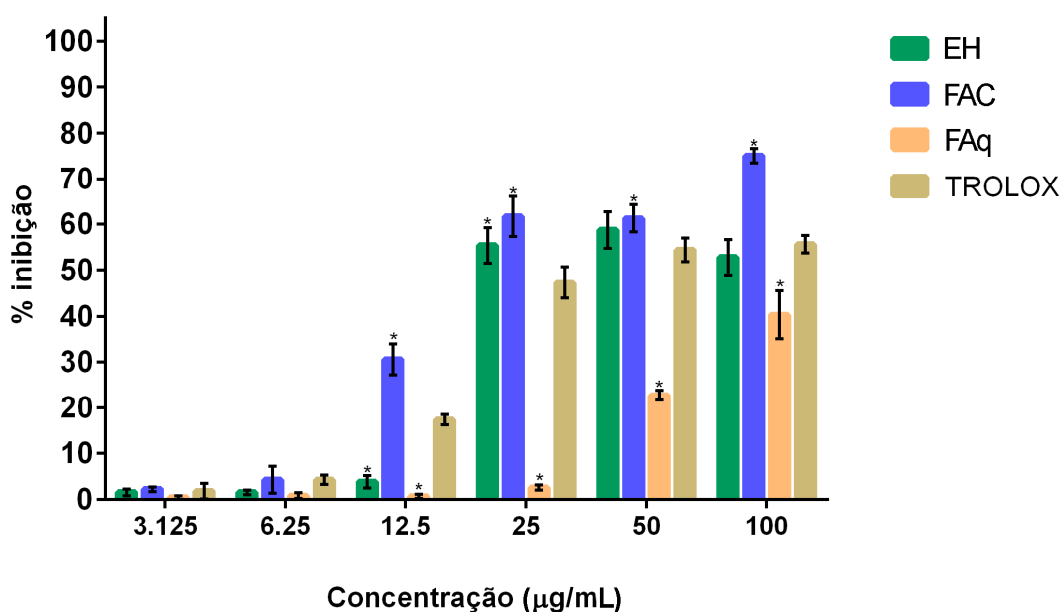


### 4.6.3 Ensaio de captura do Ácido Hipocloroso (HOCl)

Foi submetido aos ensaios antioxidantes de importância biológica apenas o extrato que apresentou a melhor atividade anti-*H.pylori* e antioxidante na triagem inicial, nesse caso foi analisado o EH e suas frações, excetuando a fração hexânica que não demonstrou importante atividade antioxidante na triagem preliminar.

Dentre as amostras testadas no ensaio de captura do HOCl, o EH e FAC capturaram acima de 50% na concentração de 25 µg/mL, tendo CE<sub>50</sub> de 17,58 ± 2,79 µg/mL e 15,50 ± 0,80 µg/mL, respectivamente. O padrão antioxidante obteve CE<sub>50</sub> de 16,02 ± 1,78 µg/mL.

Os resultados dos percentuais de inibição e a análise estatística podem ser vistos na figura 15.



**Figura 15** - Porcentagem de inibição do HOCl na presença de diferentes concentrações de TROLOX (controle), do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e suas frações acetonitrila/clorofórmio (FAC) e aquosa (FAq). \* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

Os resultados em porcentagem de inibição mostram que a FAC conseguiu atingir 75% de inibição do HOCl, enquanto que o EH e a FAq atingiram 52% e 40%, respectivamente, na maior concentração testada. A análise estatística confirmou um

desempenho superior de algumas amostras em relação ao TROLOX, em determinadas concentrações.

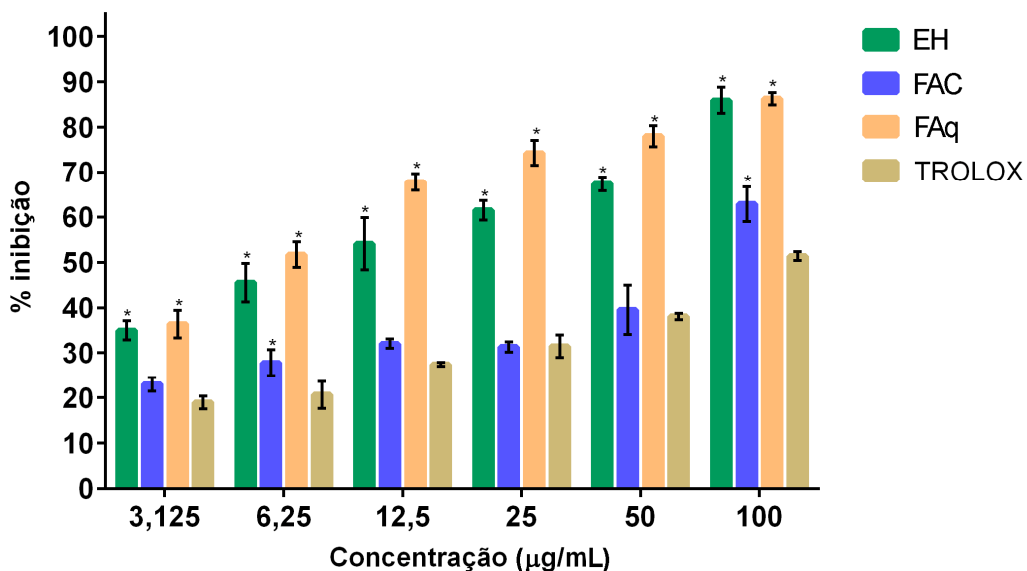
Para o EH e para a FAC, nas concentrações iniciais, entre 3,125 e 6,25 µg/mL, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao TROLOX. Ao passo que na concentração de 12,5 µg/mL houve diferença significativa entre as amostras testadas e o padrão ( $p < 0,05$ ). No entanto, é importante ressaltar que a diferença significativa com a FAC reflete uma melhor atividade desta quando comparada ao TROLOX. Nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL houve diferença significativa, porém com um desempenho superior conquistado pela FAC. O EH demonstrou, na concentração de 25 µg/mL, um desempenho superior em relação ao padrão antioxidante, já nas concentrações de 50 e 100 µg/mL não houve diferença significativa quando se comparou o padrão ao EH. A FAq teve seu desempenho inferior ao TROLOX. A análise de correlação mostrou que para flavonoides totais houve uma forte correlação negativa indicada pelo  $r$  de pearson ( $r = -0.9824$ ) frente ao  $CE_{50}$ , ao passo que para polifenóis totais e taninos não houve correlação.

#### 4.6.4 Ensaio de captura do Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Os resultados do ensaio de inibição do  $O_2^{\cdot-}$  estão apresentados na figura 16. EH, FAq e FAC obtiveram  $CE_{50}$  de  $9,52 \pm 1,48$  µg/mL,  $5,85 \pm 0,86$  µg/mL e  $52 \pm 4,73$  µg/mL, respectivamente. O padrão antioxidante obteve  $CE_{50}$  de  $88,81 \pm 2,92$  µg/mL, valor bem acima dos encontrados para o EH de *B. trimera* e suas frações.

A análise estatística também demonstrou um desempenho superior das amostras em relação ao TROLOX. Em todas as concentrações do EH e da FAq houve diferença significativa comparado ao TROLOX ( $p < 0,05$ ), comprovando o desempenho superior ao da substância padrão antioxidante. A porcentagem de inibição alcançou valores de 86% de inibição para ambas as amostras (EH e FAq), na concentração de 100 µg/mL. A FAC apresentou 62% de inibição do  $O_2^{\cdot-}$  na maior concentração e somado a isso, apresentou diferença significativa quando comparada ao TROLOX em 6,25 µg/mL, bem como em 100 µg/mL, apresentando atividade superior ao padrão. Os resultados mostram que houve forte correlação negativa, entre polifenóis totais e o  $CE_{50}$  assim como entre este e o teor de taninos

totais, indicados pelo valor de  $r$ , -0.8917 e -0,9473, respectivamente. Para flavonoides não houve correlação.

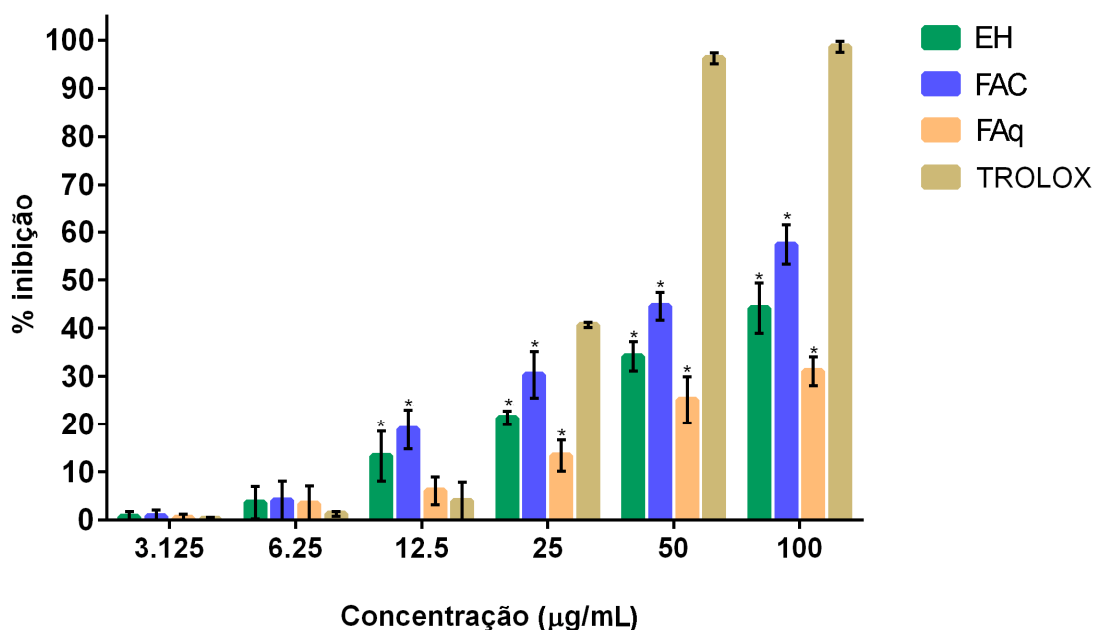


**Figura 16** - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do  $O_2^{\cdot-}$ . O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante.

\* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

#### 4.6.5 Ensaio de captura do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

Na figura 17 estão apresentados os resultados para o ensaio do  $H_2O_2$ . A FAC obteve  $CE_{50}$  de  $66,70 \pm 2,30$  µg/mL, inibindo 57,38% na maior concentração testada. EH e FAq apresentaram 44,16%, 31,07% de captura, respectivamente, em 100 µg/mL. O padrão antioxidante capturou acima de 50% na concentração de 50 µg/mL, onde obteve 96% de inibição e seu  $CE_{50}$  foi de  $26,88 \pm 0,34$  µg/mL.



**Figura 17** - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do  $H_2O_2$ . O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante. \* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

A análise estatística demonstrou que nas concentrações onde se obteve maior porcentagem de inibição, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , todas as amostras demonstraram diferença significativa quando comparados ao padrão antioxidante ( $p < 0,05$ ). Já na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , o EH e FAC demonstraram um desempenho superior ao do padrão antioxidante. Na análise de correlação foi verificado que para flavonoides totais houve uma forte correlação negativa com os valores de  $CE_{50}$ , indicada pelo  $r$  de Pearson ( $r = -0.9458$ ). Ao comparar os resultados de  $CE_{50}$  com o teor de taninos e polifenóis totais observamos que não foi encontrada correlação.

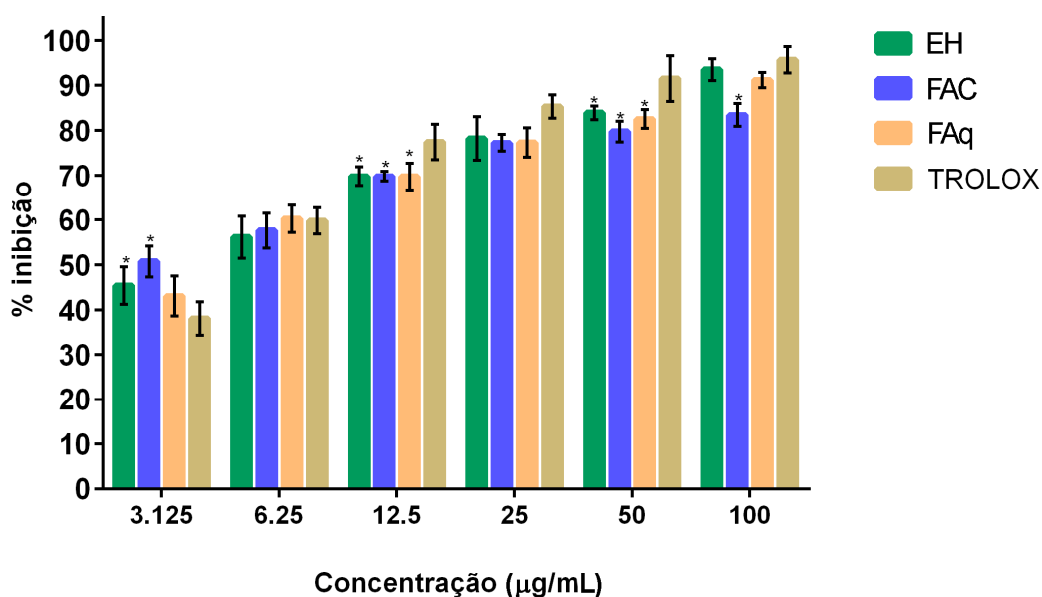
#### 4.6.6 Ensaio de captura do radical Hidroxil ( $HO^\bullet$ )

Os resultados para inibição do radical  $HO^\bullet$  estão apresentados na figura 18. Neste ensaio, todas as amostras testadas inibiram a atividade do radical acima de 50% a partir da concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , semelhante ao que ocorreu para o controle. O TROLOX apresentou  $CE_{50}$  de  $4,59 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$ . O EH, a FAq e a FAC apresentaram valores de  $CE_{50}$  de  $4,27 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$ ,  $4,06 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$  e  $2,90 \pm$

0,48 µg/mL, respectivamente. Na maior concentração avaliada o EH inibiu 93,52% do radical, já a FAC e FAq inibiram respectivamente 83,43% e 91,18%. O padrão atingiu 95,68% de inibição do radical HO<sup>•</sup> na concentração de 100 µg/mL.

O EH nas concentrações de 6,25, 25 e 100 µg/mL, não apresentou diferença significativa comparada ao padrão antioxidante ( $p>0,05$ ), todavia em 3,125 µg/mL houve diferença significativa em relação ao padrão ( $p<0,05$ ), com desempenho superior para o extrato.

A FAq nas concentrações de 3,125, 6,25, 25 e 100 µg/mL não demonstrou diferença significativa frente ao controle antioxidante. Para FAC não houve diferença significativa em relação ao padrão nas concentrações de 6,25 e 25 µg/mL, já na concentração de 3,125 µg/mL houve diferença significativa, porém com desempenho superior para a FAC. Para ensaio de captura do radical HO<sup>•</sup>, não foi observado correlação com nenhum dos metabólitos secundários avaliados.



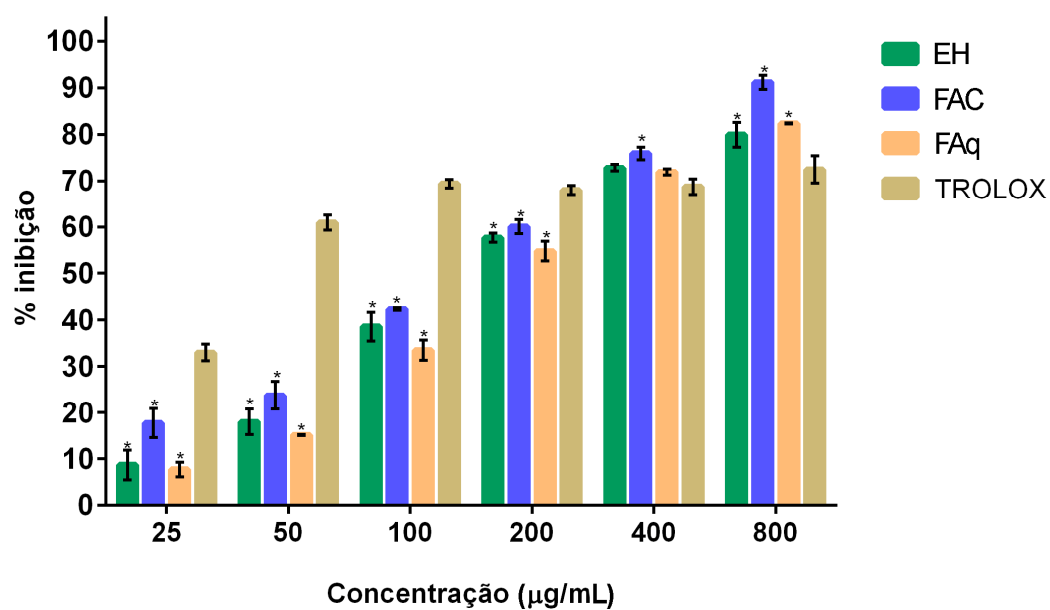
**Figura 18** - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do HO<sup>•</sup>. O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante.

\* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p<0,05$ .

#### 4.6.7 Ensaio de captura do Óxido Nítrico (NO<sup>•</sup>)

Os resultados de inibição do NO<sup>•</sup> são mostrados na figura 19. Neste ensaio todas as amostras testadas, EH, FAq e FAC, inibiram a espécie reativa avaliada acima de 50% na concentração de 200 µg/mL. O TROLOX inibiu mais de 50% na concentração de 50 µg/mL. O EH, FAC e FAq apresentaram CE<sub>50</sub> de 167,5 ± 3,8, 132,13 ± 7,38, 183,5 ± 8,65 µg/mL, respectivamente. A FAC teve a maior percentagem de inibição nas concentrações mais elevadas, atingindo 91,19% de inibição em 800 µg/mL. O TROLOX na mesma concentração atingiu 72,47% de inibição. Já o EH e FAq alcançaram 79,95 e 82,34% de inibição na maior concentração, respectivamente.

Na concentração de 400 µg/mL, EH e FAq não apresentaram diferença significativa em comparação com TROLOX ( $p>0,05$ ), enquanto que na concentração de 800 µg/mL, o extrato e a fração demonstraram diferença significativa em comparação ao TROLOX ( $p<0,05$ ), mas apresentaram desempenho superior ao padrão antioxidante. Em relação à FAC a partir da concentração de 400 µg/mL houve diferença significativa em comparação ao TROLOX, porém, tanto em 400 µg/mL quanto em 800 µg/mL a fração foi superior na comparação com o padrão antioxidante. Para este teste houve uma forte correlação negativa comparando o CE<sub>50</sub> e o teor de flavonoides totais ( $r = -0,8301$ ). Já para taninos e polifenóis totais não foi verificado correlação.



**Figura 19** - Porcentagem de inibição do extrato hidroalcoólico (EH) de *B. trimera* e de suas frações, fração acetonitrila/clorofórmio (FAC) e fração aquosa (FAq) para o teste de captura do NO<sup>•</sup>. O composto TROLOX foi usado como controle antioxidante.

\* Diferenças significativas em relação ao TROLOX,  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

A erradicação de *H. pylori* em indivíduos infectados se apresenta como uma estratégia de tratamento de úlceras pépticas, diminuindo complicações associadas a esta doença (BARKUN; LEONTIADIS, 2010). Úlceras pépticas, assim como o câncer gástrico e outras doenças gastrointestinais, que estão associadas a infecção por *H. pylori*, estão intimamente ligadas a produção excessiva de espécies reativas, seja de oxigênio ou nitrogênio.

O trato gastrointestinal é um importante local de origem de espécies reativas, pois os processos infecciosos levam a ativação de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, favorecendo o estresse oxidativo (BHATTACHARYYA et al., 2014). De acordo com DING et al. (2007), infecções por *H. pylori* aumentam a produção de espécies reativas em células epiteliais gástricas infectadas, podendo levar estas a apoptose. Logo, um composto que seja capaz de minimizar os danos mediados pelo estresse oxidativo, além de ter atividade anti-*H. pylori*, é fundamental para o tratamento e prevenção das lesões oriundas dessa infecção. Na busca por um composto com esse perfil foram testados os extratos EE, EAq e EH de *B. trimera*. E com os resultados demonstrando uma melhor atividade do EH, tanto antioxidante como anti-*H. pylori*, foi realizado o fracionamento deste extrato, obtendo as frações FAC, FAq e FHx, que também foram testadas.

Na avaliação do crescimento bacteriano, os resultados mostraram que o EH teve CIM<sub>90</sub> de 512 µg/mL e para a FAC o valor foi de 1024 µg/mL, com atividade bactericida nesta concentração. Estudos semelhantes demonstraram resultados anti-*H. pylori* próximos aos valores encontrados. Silva et al. (2012), demonstrou que o EH de *Terminalia macroptera* obteve CIM<sub>50</sub> a partir da concentração de 200 µg/mL. Já Palacios-Espinosa et al. (2013), avaliando a capacidade anti-*H. pylori* da fração butanólica de *Cuphea aequipetala* indicou CIM superior a 500 µg/mL. Os extratos aquosos de *Hibiscus sabdariffa* e *Dianthus caryophyllus* apresentaram CIM superior a 1000 µg/mL (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2009).

A análise morfológica de *H. pylori* com as amostras que atingiram o CIM<sub>90</sub> foi realizada através de MEV, onde foi observado que as amostras testadas alteraram significativamente a morfologia celular bacteriana. Na literatura, a *H. pylori* tem sido



demonstrada em basicamente duas formas morfológicas características, a forma helicoidal, que seria a forma replicável (figuras 8A e 8B) e a forma cocóide que é considerada uma forma degenerada, não replicável (KUSTERS et al., 1997).

As formas morfológicas identificadas através da MEV, após exposição às amostras, mostraram-se diferenciadas, com alterações como por exemplo, bolhas e rupturas, que podem levar a morte celular. Essas alterações morfológicas em geral, são relacionadas a interação de dado composto a uma ou mais proteínas de ligação a penicilina (PBP) presentes em *H. pylori*, que resultam na conseqüente inibição das enzimas responsáveis pela síntese do peptideoglicano (O'ROURKE & BODE, 2001). Este fato pode, amparado pelos resultados obtidos na MEV, sugerir um provável mecanismo de ação para as amostras testadas, que poderia ser uma possível ação comprometendo a síntese de peptideoglicano, afetando a integridade da parede celular bacteriana.

Em um estudo semelhante feito com azetreonam por Deloney e Schiller (1999), foi mostrado a presença de bactérias filamentosas. De acordo com Curtis et al. (1979), a cefuroxima tem a capacidade de bloquear a divisão celular, por ligar-se as proteínas de ligação de penicilina 3 (PBP3), levando a filamentação da célula bacteriana. Em relação ao trabalho de Deloney e Schiller (1999), a PBP indicada por eles com massa molecular de 63 kDa (chamada PBP63) seria o principal fator para o processo de septação bacteriana em *H. pylori*, logo a inibição dessa PBP em especial, promoveria o fenômeno de filamentação bacteriana, como o reportado para o medicamento azetreonam, por exemplo. Este evento, de filamentação da célula bacteriana, foi observado no presente estudo e registrado em uma única imagem, na concentração 1024 µg/mL para a FAC, sugerindo novamente, um dos prováveis mecanismos de ação e a necessidade da realização de estudos futuros que esclareçam os efeitos das amostras testadas.

De acordo com Dzoyem et al. (2013) flavonoides teriam a capacidade de causar danos a membrana bacteriana, levando a morte celular. Com relação a atividade e estrutura, é possível situar que a hidroxilação na posição 2', em isoflavonas, parece ser de grande importância para a atividade antimicrobiana de flavonoides, frente a por exemplo, *Streptococcus*. Mais recentemente, foi demonstrado a importância do grupo hidroxila na posição 5 de flavanonas e flavonas

para atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Ao passo que a hidroxilação parece ser muito importante para a atividade antibacteriana, a metoxilação foi reportada como responsável pelo decréscimo da atividade antibacteriana de flavonoides. Outro ponto importante são as substituições no anel B da 3-metilenoflavanona, adicionando cloro ou bromo, que aparentemente aumentaria em torno de 4 vezes a atividade desses derivados frente a *Enterococcus faecalis* e *S. aureus*. Alguns flavonoides com essas características já foram isolados a partir de extratos de *Baccharis trimera*. Flavonas como a luteonina, genkwanina, apigenina, cirsimaritina que apresentam hidroxila na posição 5 foram isoladas. Além disso também foi isolado o flavonol quercetina, sugerindo uma importante atividade antimicrobiana dessa planta. (CUSHNIE; LAMB, 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005)

Já outro estudo realizado por Jasmine, Selvakumar e Daisy (2011) mostrou que o extrato de *Elephantopus scaber*, apresentou atividade antibacteriana, por destruição de membranas, mecanismo esse atribuído a presença de terpenos. Triterpenos também tem sido reportados com atividade antibacteriana (ZHANG; MEN; LEI, 2014). No estudo realizado por Evaristo et al. (2014) o triterpeno 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno isolado de *Combretum leprosum* teve atividade bactericida na concentração de 15,6  $\mu$ g/mL frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*. De acordo com Nascimento et al. (2014), o ácido ursólico, um triterpeno pentacíclico, demonstrou CIM frente a algumas bactérias, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*, dentre outras, ressaltando a atividade antimicrobiana dessa classe de metabólitos secundários.

Galluci et al. (2009) relatam a importante atividade de terpenos fenólicos como o carvacrol, por exemplo, na inibição do crescimento de *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*. Essa atividade foi atribuída ao anel fenólico e ao grupo hidroxila presente na estrutura. O autor destaca também a importância da posição do grupo hidroxila no anel fenólico para o bom desempenho do carvacrol, já que o monoterpene timol apresentou um desempenho inferior, e a única diferença entre o timol e o carvacrol é o posicionamento da hidroxila.

Pode-se sugerir e destacar que, a presença de flavonoides e terpenos no EH e FAC, foram fundamentais para a boa atividade anti-*H.pylori*. Todavia, os taninos

também têm sido indicados como detentores de atividade antimicrobiana. Basicamente seus mecanismos de ação propostos são inibição enzimática, complexação de íons essenciais e inibição da fosforilação oxidativa (SCALBERT, 1991; SANTOS et al., 2009).

Comparando com os resultados da fitoquímica preliminar e doseamento é possível observar que o reduzido teor de flavonoides no EAq somado a ausência de triterpenos, pode ser uma justificativa para o baixo desempenho desse extrato no teste anti-*H. pylori*. Enquanto que o pequeno teor de flavonoides, somado a possível variação na estrutura e quantidade de terpenos, aliado ao baixo teor de taninos, pode se sugerir o motivo da menor atividade do EE no ensaio de inibição de *H. pylori*. Ao passo que a maior concentração de polifenóis e flavonoides totais obtidas entre os extratos, pertencente ao EH, somado a presença de terpenos e taninos, parece ser crucial para o efeito anti-*H. pylori*.

Com relação as frações, a presença de terpenos, mas ausência de flavonoides e taninos, nos leva a entender a menor capacidade da FHx se comparada as outras frações em inibir o crescimento bacteriano. Já a menor concentração de flavonoides na FAq pode justificar a ausência de CIM<sub>90</sub>, enquanto a elevada concentração de flavonoides na FAC, somado a presença de terpenos e taninos, pode refletir na sua capacidade bactericida.

A capacidade de inibição da enzima urease tanto dos extratos de *B. trimera* e das frações do EH também foi avaliado. A urease é um importante fator de virulência produzido por *H. pylori*. Permite a elevação de pH do meio gástrico, através da hidrólise de uréia em amônia, favorecendo a sobrevivência da bactéria (MACEGONIUK, 2013). Nessa investigação a FAC apresentou a maior capacidade de inibição, porém ainda assim, abaixo dos 50%. XIAO et al. (2013) indicam boa atividade de inibição de urease mediada por flavonoides, porém essa atividade varia de acordo com a estrutura. Fato este que pode ser uma das justificativas para entender a fraca atividade obtida pelas amostras testadas.

Vários estudos demonstraram a capacidade antioxidante de extratos de *B. trimera* (PÁDUA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011). De acordo com SIMÕES-PIRES et al. (2005), um dos principais fatores que contribuem para a capacidade antioxidante

da espécie é a presença de flavonoides. No presente estudo, uma importante atividade antioxidante foi demonstrada pelo EH de *B. trimera* e pelas suas frações FAq e FAC.

Neste estudo foi utilizado inicialmente os ensaios de captura dos radicais artificiais DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e ABTS•+ [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]. Estes radicais artificiais dão resultados de uma atividade antioxidante geral ou preliminar. Dessa forma, estes ensaios são amplamente utilizados para se determinar se algum extrato ou até mesmo substância isolada possui atividade antioxidante promissora, podendo então, direcionar à um estudo aprofundado frente a espécies reativas de interesse biológico, como por exemplo: o anion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) ácido hipocloroso (HOCl) (VASCONCELOS et al., 2007).

No ensaio de inibição do radical ABTS•+, apenas a FHx do EH não inibiu 50% do radical. Também foi verificado forte correlação negativa entre os  $CE_{50}$  e os polifenóis totais, já entre o  $CE_{50}$  comparado ao conteúdo de flavonoides e taninos totais foi obtido uma correlação moderada. Os resultados obtidos nesse ensaio corroboram a importância de compostos fenólicos como agentes antioxidantes.

No ensaio de captura do radical DPPH, os resultados foram semelhantes. Excetuando a FHx, todas as amostras testadas inibiram acima de 50% do radical, porém em concentrações diferentes. Foi demonstrado moderada a forte correlação negativa entre o  $CE_{50}$  das amostras testadas e o teor de polifenóis totais. Comparando o  $CE_{50}$  com o teor de taninos totais foi observado forte correlação negativa. Houve um menor desempenho frente ao radical DPPH se comparado ao ABTS•+. Este fato pode ter como provável justificativa o fenômeno do bloqueio estérico, que pode impedir ou retardar a reação no ensaio do DPPH. Quanto mais próximo os grupos hidroxila da amostra estiver do nitrogênio desemparelhado do radical DPPH, maior a facilidade de reação, logo, a atividade frente ao radical DPPH pode ser influenciado pelas características estruturais da molécula antioxidante (ALISI et al., 2012; SARAFIANOS et al., 1999).

Um estudo realizado por Zielinski et al., (2013) encontrou correlação entre o percentual de inibição referente a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais ( $r = 0,87$ ), no ensaio de captura do radical DPPH, de chás de diferentes plantas medicinais. Para flavonoides também foi observado correlação com a capacidade antioxidante no teste de captura do radical DPPH ( $r = 0,79$ ). Os compostos que mostraram correlação significativa com a atividade antioxidante foram o ácido gálico, epicatequina, catequina, procianidina B2, cafeína e quercetina. Esta literatura ratifica a correlação obtida no presente trabalho, entre polifenóis e atividade de inibição do DPPH. Já Zhao et al. (2011) apresentou um resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, ao verificar importante correlação entre o  $CE_{50}$  e o teor de taninos totais em relação a atividade antioxidante de extratos de *Castanea mollissima*. Sendo assim, é possível inferir, novamente, a alta relevância de compostos fenólicos na atividade antioxidante.

Os resultados preliminares obtidos envolvendo extratos brutos, na presente pesquisa, mostram que a presença de compostos tanto de características polares como também de média polaridade, resultam num melhor desempenho na triagem antioxidante, com os radicais sintéticos.

O EH foi fracionado devido ao seu citado melhor desempenho na triagem antioxidante e principalmente devido sua capacidade de inibir o crescimento de *H. pylori* que se demonstrou superior ao dos outros extratos. Após o fracionamento as partições obtidas foram submetidas também, a ensaios com oxidantes de interesse biológico ( $HOCl$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$  e  $NO^{\cdot}$ ).

O  $HOCl$  é um poderoso oxidante e microbicida, entretanto também pode estar associado a danos em tecidos do hospedeiro. É produzido a partir da enzima MPO, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos polimorfonucleares, que catalisa a oxidação do cloreto ( $Cl^-$ ) na presença de  $H_2O_2$ , formando  $HOCl$  (PULLAR; VISSERS; WINTERBOURN, 2000). No ensaio de inibição do  $HOCl$ , uma significativa atividade do EH e FAC de *B. trimera* foi demonstrada. A FAq foi a única fração incapaz de inibir o radical acima de 50% mesmo na concentração máxima. No ensaio foi encontrado uma forte correlação negativa entre o  $CE_{50}$  e o conteúdo de flavonoides totais. Logo, o menor percentual de flavonoides encontrados na FAq parece justificar seu menor desempenho nesse teste. A considerável inibição de  $HOCl$  pelo EH e

FAC pode ser extremamente importante em uma eventual infecção por *H. pylori*, visto que, em uma mucosa infectada é comum a formação de amônia derivada da ação da urease. Contudo, a amônia tende a reagir com o HOCl formando cloraminas, especificamente, monocloraminas ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), esse composto é lipofílico capaz de penetrar membranas celulares e oxidar componentes no interior da célula, sendo altamente citotóxico. Logo, a inibição do HOCl pode ser fundamental para minimizar a formação de monocloraminas nessa infecção, por exemplo (NAITO; YOSHIKAWA, 2002; NISHIZAWA; SUZUKI, 2014). Em um estudo realizado por Valentão et al. (2002) foi observada uma inibição de aproximadamente 50% do HOCl, obtido pela infusão de *Cynara cardunculus* na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , este resultado reforça ainda mais a importância dos resultados obtidos pelo EH e FAC no presente estudo que obtiveram 52 e 75% de inibição, respectivamente, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é considerado o precursor base das mais variadas espécies reativas de oxigênio (SHARMA et al., 2012). Embora seja um moderado agente oxidante, ele é crucial para a formação do  $\text{HO}^{\cdot}$ , que é altamente lesivo responsável por importantes danos ao DNA (VALKO et al., 2004). Foi verificado que o EH e a FAq foram capazes de inibir fortemente o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e obtiveram  $\text{CE}_{50} < 12,5 \mu\text{g/mL}$ . Os resultados revelaram também, que houve forte correlação negativa entre polifenóis/taninos totais e os  $\text{CE}_{50}$  obtidos para o ensaio de captura do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Os resultados encontrados são semelhantes ao relatado por Heras et al. (1998), que mostraram que extratos de *B. trinervis* obtiveram  $78,5\% \pm 1,3$  de inibição frente a inibição do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A importância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  está centrada no fato de poder atravessar membranas celulares e de reagirem com íons  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  levando a formação radical  $\text{HO}^{\cdot}$  e de reagirem com cloreto, formando HOCl (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BRIEGER et al., 2012). A melhor atividade foi obtida pela FAC com  $\text{CE}_{50}$  de 66,70  $\mu\text{g/mL}$ . O EH e a FAq não atingiram 50% de inibição nas concentrações testadas. Para este teste foi identificado a existência de forte correlação negativa entre flavonoides totais e os  $\text{CE}_{50}$  obtidos. Importante destacar que justamente a fração com maior concentração de flavonoides foi a única amostra capaz de inibir acima de 50% do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sugerindo grande importância da atividade antioxidante dos flavonoides e estando de acordo com outros trabalhos presentes na literatura

(WANG; WANG, 2015; ZIELIŃSKA; ZIELIŃSKI, 2011). Em um estudo realizado por Ko et al. (2015), os autores relatam uma elevada capacidade de inibição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  reportando valores de  $\text{CE}_{50}$ , de acordo com a metodologia empregada, de 76,1 e 71,4  $\mu\text{g/mL}$  por exemplo, para extratos de *Machilus japonica* e *Machilus thunbergii* respectivamente, corroborando o considerável desempenho obtido pela FAC no presente estudo.

O radical  $\text{HO}^\bullet$ , dentre as espécies reativas, é considerado o mais reativo. Ele é reconhecido por sua capacidade de promover mutações no DNA, podendo, de forma direta, contribuir para a ocorrência de eventos como a carcinogênese, mutagênese e citotoxicidade (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011; SHARMA et al., 2012). Em todas as amostras testadas foram encontradas inibições acima de 50% a partir da concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , embora a FAC tenha alcançado este valor em 3,125  $\mu\text{g/mL}$ . Não foi observado correlação entre os resultados de  $\text{CE}_{50}$  e o teor dos metabólitos secundários analisados. Isto pode ser explicado devido a alta reatividade do radical  $\text{HO}^\bullet$  que pode ter eventualmente reagido com outros compostos presentes nas amostras testadas, em questão de microsegundos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004), não permitindo que fosse verificado correlação nesse caso. Estudos semelhantes ao nosso, como o de Vieira et al., (2011), obtiveram valores baixos de  $\text{CE}_{50}$  para extratos etanólicos de *Baccharis sp.* frente ao radical  $\text{HO}^\bullet$ . Dentre essas plantas destacamos a *B. trimera* com  $\text{CE}_{50}$  de  $15 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ , e *B. articulata*, *B. spicata* e *B. usterii*, que obtiveram  $\text{CE}_{50}$  de,  $17 \pm 1$ ,  $18 \pm 2$  e  $12 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

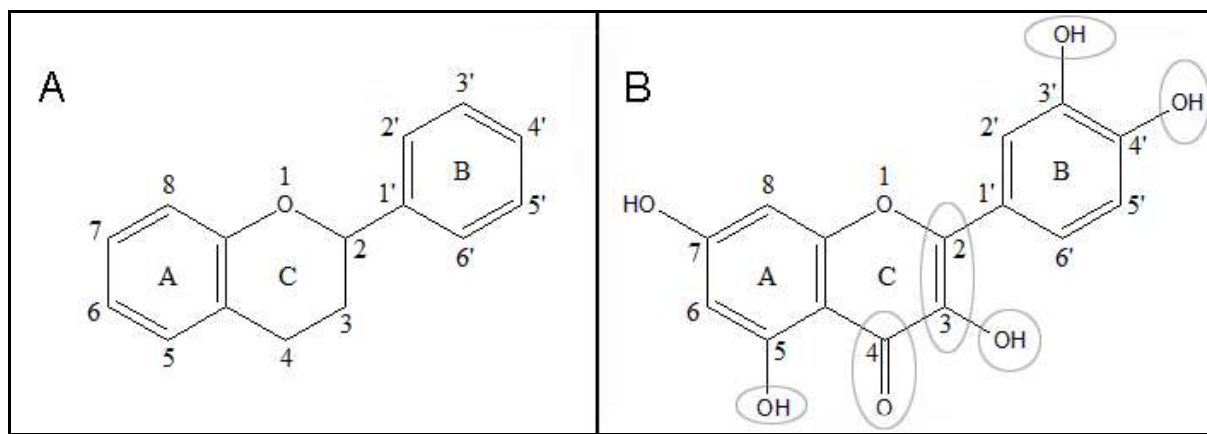
Em infecções por *H. pylori*, estudos relatam aumento da expressão da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) em células mononucleares e neutrófilos, resultando em um possível aumento da concentração de  $\text{NO}^\bullet$  disponível, contribuindo para a morte celular (KIM, 2005; MANNICK et al., 1996). Nos ensaios de inibição do  $\text{NO}^\bullet$ , dentre as amostras testadas, a FAC teve o maior percentual de inibição nas concentrações mais elevadas. Foi verificado uma forte correlação negativa entre  $\text{CE}_{50}$  e flavonoides totais. Estes resultados atestam a importante atividade antioxidante dos flavonoides presentes nesta fração. Khan et al. (2009) identificaram que a quercetina foi capaz de proteger a proteína cistatina de potenciais danos resultantes da produção de  $\text{NO}^\bullet$ , reforçando o provável papel antioxidante dos flavonoides. Os resultados obtidos pela FAq, FAC e EH neste estudo, foram

superiores ao descrito por Maia et al. (2010), que avaliou o desempenho do extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* frente ao ensaio de captura de NO<sup>•</sup>. Este extrato na concentração de 1000 µg/mL conseguiu inibir em torno de 20% a formação de nitrito, indicando assim indiretamente, a captura de aproximadamente 20% do NO<sup>•</sup> liberado pelo NPS.

Os compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos, tem importante atividade antioxidante devido a presença de hidroxilas (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; SAEED; KHAN; SHABBIR, 2012). Esses compostos podem inibir a atividade oxidante de diversas maneiras, dentre elas; sequestro direto das espécies reativas, inibição enzimática, quelação de metais, entre outras (BENDARY et al., 2013; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Citando os compostos fenólicos, o grau de metoxilação, os tipos de compostos a serem reduzidos são, dentre outros, parâmetros essenciais que contribuem para a atividade antioxidante de determinado composto fenólico. A capacidade de deslocalização de elétrons é outra importante característica que influencia positivamente a capacidade antioxidante de fenóis (MALIK et al., 2014). A capacidade de doar hidrogênio, característica que pode explicar a atividade antioxidante, tanto de polifenóis de modo geral, como de flavonoides especificamente, também parece estar intimamente associada a posição e também ao número de hidroxilas livres em sua estrutura (FORMAGIO et al., 2013; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Em relação especificamente a flavonoides, algumas características estruturais são associadas a capacidade antioxidante. O grupo catecol no anel B, por exemplo, confere elevada estabilidade ao radical flavonoil formado logo depois da reação com um determinado radical livre. Outra característica importante, que esta associada a capacidade antioxidante, é a dupla ligação na posição 2,3 em conjugação com função 4-oxo da carbonila no anel C. A presença de grupos hidroxilas na posição 3 e 5 também está relacionado a atividade antioxidante dos flavonoides. Como um exemplo para essas características demonstradas podemos destacar a quercetina, metabólito já isolado em *B. trimera* (Figura 20) (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; YORDI et al., 2012).





**Figura 20** - Núcleo central da maioria dos flavonoides (A); Flavonoide quercetina e algumas características importantes para atividade antioxidante de flavonoides (B) (Modificado de HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Com os resultados é possível sugerir que, tanto o EH quanto as frações testadas, apresentaram importantes atividades biológicas *in vitro*, que direcionam para o tratamento e prevenção de distúrbios gástricos causados por *Helicobacter pylori*, tornando as amostras testadas, possíveis alvos de investigações *in vivo* no futuro.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com a avaliação dos extratos de *B. trimera* e frações do EH, podemos concluir que:

- Dentre os extratos, o EH apresentou o melhor resultado antioxidante na triagem preliminar, nos ensaios de captura do radical DPPH e ABTS;
- Também dentre os extratos, o EH apresentou o melhor resultado anti-*H.pylori* tendo demonstrado CIM<sub>90</sub> na concentração de 512 µg/mL;
- Excetuando a fração hexânica, todas as frações testadas demonstraram um bom desempenho na triagem antioxidante preliminar;
- Em relação aos ensaios antioxidantes de importância biológica as amostras testadas (EH, FAq e FAC), demonstraram importante capacidade de inibição das seguintes espécies reativas: HOCl, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO<sup>•</sup> e NO<sup>•</sup>;
- A atividade antioxidante das amostras avaliadas parece depender diretamente da presença de polifenóis, flavonoides e taninos, fato que pode ser confirmado analisando as correlações entre a atividade antioxidante e o teor desses metabólitos secundários;
- Na avaliação da atividade anti-*H. pylori* a FAC atingiu o CIM<sub>90</sub> na concentração de 1024 µg/mL, onde também foi bactericida; A FAq não atingiu a CIM<sub>90</sub> nas concentrações testadas mas também demonstrou um bom desempenho;
- A atividade anti-*H. pylori* pode ser atribuída com destaque aos flavonoides, mas não menos importante também é válido mencionar os taninos e terpenos;
- Tanto o EH quanto a FAC, amostras que atingiram CIM<sub>90</sub>, demonstraram capacidade de alterar morfológicamente a bactéria *H. pylori*, fato este confirmado pela realização da microscopia eletrônica de varredura. Nesse ponto é importante destacar a FAC devido as alterações mais evidentes. Foi visualizado filamentação bacteriana o que sugere, um possível mecanismo de ação, que seria a inibição de PBP's.
- A FAC foi a amostra que demonstrou a maior capacidade de inibir a enzima urease, embora essa inibição não tenha atingido e nem ultrapassado 50%.

Em resumo, os resultados *in vitro* indicam que principalmente o EH, FAC e FAq contêm compostos naturais com propriedades antioxidantes e anti-*H. pylori*, por meio dos quais elas são candidatas a testes *in vivo*, assim como alvos de estudos de isolamento, visando elucidar os possíveis compostos responsáveis por estas atividades e também para determinar o possível mecanismo da atividade anti-*H. pylori*.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **ARKIVOC**, v. 2007, p. 76-96, 2007.
- ALLEN, L. A. H. et al. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. **The Journal of immunology**, v. 174, p. 3658-3667, 2005.
- ALISI, M. A. et al. DPPH radical scavenging activity of paracetamol analogues. **Tetrahedron**, v. 68, p. 10180-10187, 2012.
- ALLEN, L. A. H.; MCCAFFREY, R. L. To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. **Immunological reviews**, v. 219, p. 103-117, 2007.
- AYALA, G. et al. Resistance to antibiotics and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from antrum and body from adults in Mexico. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 17, p. 149-155, 2011.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, p. 141-155, 1997.
- BALBOA, M. A.; PEREZ, R.; BALSINDE, J. Amplification mechanisms of inflammation: paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A<sub>2</sub> is regulated by cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. **The journal of immunology**, v. 171, p. 989-994, 2014.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **American journal of medicine**, v. 123, p. 358-366, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BAUD, O. et al. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. **The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience**, v. 24, p. 1531-1540, 2004.
- BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.
- BENDARY, E. et al. Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. **Annals of agricultural sciences**, v. 58, p. 173-181, 2013.

BERNARD, M.; D'ELIOS, M. M. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: Friend or foe? **Toxicon: official journal of the international society on toxinology**, v. 56, p. 1186-1192, 2010.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, p. 329-354, 2014.

BIONDO, T. M. A. et al. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, p. 368-373, 2011.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The world allergy organization journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BITTENCOURT, P. F. S. et al. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **Jornal de pediatria**, v. 82, p. 325-334, 2006.

BOILARD, E. et al. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A<sub>2</sub> in immune complex-mediated arthritis. **EMBO Molecular medicine**, v. 2, p. 172-187, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13.05.2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. 13.05.2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. 154 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n. 31)

BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease. **The European journal of medical sciences**, v. 142, p. 13659-13672, 2012.

CARREIRA, R. C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações entes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica**. 2007. 199 f. Tese - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente/SP, São Paulo, 2007.

CASTILLO-JUÁREZ, I. et al. Anti- *Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of ethnopharmacology**, v. 122, p. 402-405, 2009.

CHAKRABORTI, S. et al. The molecular basis of inactivation of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* using polyethyleneimine functionalized zinc oxide nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-9, 2013.

CHEY, W. D.; WONG, B. C. Y. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. **The American journal of gastroenterology**, v. 102, p. 1808-1825, 2007.

CHING, T. L.; JONG, J. DE; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-Thio-2-Nitrobenzoic acid: Application to anti-asthmatic drugs. **Analytical biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CLAVERIE-MARTIN, F.; DIAZ-TORRES, M. R.; GEOGHEGAN, M. J. Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. **Current microbiology**, v. 16, p. 281-287, 1988.

COELHO, L. G. V. et al. Eficácia do regime terapêutico empregando a associação de pantoprazol, claritromicina e amoxicilina, durante uma semana, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera péptica. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 41, p. 71-76, 2004.

CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 133, p. 659-672, 2007.

COSTA, L. M. et al. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) using factorial design. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 21, p. 181-186, 2011.

COVER, T. L.; BLASER M. J. *Helicobacter pylori* in health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1863-1873, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

CURTIS, N. A. C. et al. Competition of  $\beta$ -Lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: Comparasion with antibacterial activity and effects upon bacterial morph. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 16, p. 325-328, 1979.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DAS, P. et al. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS pathogens**, v. 6, p. 1-7, 2010.

DELONEY, C. R.; SCHILLER, N. L. Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, p. 2702-2709, 1999.

- DIAS TOLEDO, L. F. **Atividade antiúlcera e toxicidade de *Baccharis trimera* (Less) DC (ASTERACEAE)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-06082008-162813/>. Acesso em: 25-01-2016.
- DIMECH, G. S. et al. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The scientific world journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- DING, S. Z. et al. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 75, p. 4030-4039, 2007.
- DZOYEM, J. P. et al. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 7, p. 66-72, 2013.
- EVARISTO, F. F. V. et al. Antimicrobial effect of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$  - trihydroxylup-20(29)-ene on planktonic cells and biofilms from gram positive and gram negative bacteria. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap.10, p.229-245
- FENGLIN, H. et al. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, p. 14-23, 2004.
- FILHO, D. B. F.; JÚNIOR, J. A. D. S. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista política hoje**, v. 18, p. 115-146, 2009.
- FISCHER, C. L. et al. Sphingoid bases are taken up by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and induce ultrastructural damage. **Skin pharmacology and physiology**, v. 26, p. 36-44, 2013.
- FORMAGIO, A. S. N. et al. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 1-8, 2013.
- GALLUCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and fragrance journal**, v. 24, p. 348-354, 2009.
- GAMBERINI, M. T. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*. **Memorias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 137-139, 1991.
- GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 4, p. 9-18, 2001.

GEETHA, S. et al. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an *in vitro* study. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, p. 373-378, 2002.

GERHARD, M. et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 96, p. 12778-12783, 1999.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA oncology**, Chicago, v. 1, p. 505-527, 2015.

GRAHAM, D. Y. Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: Implications for therapy. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1272-1277, 1998.

GRANCE, S. R. M. et al. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, p. 28-33, 2008.

GULEC, M. et al. Mirtazapine protects against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in the rat brain. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 67, p. 50-58, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical biochemistry**, v. 165, p. 215-219, 1987.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, p. 231-255, 2004.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **The American society of hematology**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HERAS, B. et al. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Journal of ethnopharmacology**, v. 61, p. 161-166, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: Inca, 2015. 126 p.

JASMINE, R.; SELVAKUMAR, B.; DAISY, P. Investigating the mechanism of action of terpenoids and the effect of interfering substances on an Indian medicinal plant extract demonstrating antibacterial activity. **International journal of pharmaceutical studies and research**, v. 2, p. 19-24, 2011.



JAMAL, C. M. **Estudo fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw e de *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae). Análise de derivados fenólicos, por CLAE.** 2002. 187 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer journal for clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

KARAM, T. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) - utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 280-286, 2013.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 47, p. 1304-1309, 2009.

KHAN, M. S.; PRIYADARSHINI, M.; BANO, B. Preventive effect of curcumin and quercetin against nitric oxide mediated modification of goat lung cystatin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 6055-6059, 2009.

KIM, H. Oxidative stress in *Helicobacter pylori* - induced gastric cell injury. **Inflammopharmacology**, v. 13, p. 63-74, 2005.

KIMURA, M. et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Microbial pathogenesis**, v. 31, p. 29-36, 2001.

KO, E. Y. et al. Evaluation on antioxidant properties of sixteen plant species from Jeju Island in Korea. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 133-145, 2015.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal medical & allied sciences**, v. 1, p. 53-60, 2011.

KUSTERS, J. G. et al. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infection and immunity**, v. 65, n. 9, p. 3672-3679, 1997.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopathology of *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 39, p. 335-342, 2003.

LIMA, V. P.; ROBENHORST, S. H. B. Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de cancerologia**, v. 55, p. 389-396, 2009.

LIN, Y. S. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection after gastric surgery. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, p. 5274-5282, 2014.

MACEGONIUK, K. Inhibitors of bacterial and plants urease. **Folia biologica et oecologica**, v. 9, p. 9-16, 2013.

MAIA, R. M. et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 20, p. 489-493, 2010.

MALIK, P. et al. Structure-Function elucidation of antioxidative and prooxidative activities of the polyphenolic compound curcumin. **Chinese journal of biology**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MANNICK, E. E. et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: Effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer research**, v. 56, p. 3238-3243, 1996.

MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of *ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 201, p. 748-755, 1994.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, v. 1, p. 1311-1314, 1984.

MAZZOLENI, L. E.; MAZZOLENI, F. Treatment and retreatment of *Helicobacter pylori*. **Cadernos de gastroenterologia**, v. 67, p. 153-164, 2010.

MEGRAUD, F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1278-1282, 1998.

MÉGRAUD, F. Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. **Gut Microbes**, v. 4, p. 541-548, 2013.

MIRABALLES, M.; GÁMBARO, A.; ARES, G. Sensory characteristics of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: influence of deodorization by steam distillation. **Food science and technology international**, v. 19, p. 485-92, 2013.

MONTEMURRO, P. et al. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, p. 1055-1062, 2001.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 33, p. 323-336, 2002.

NASCIMENTO, P. G. G. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid. **Molecules**, v. 19, p. 1317-1327, 2014.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS; METHODS FOR DILUTION ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTS FOR BACTERIA THAT GROW AEROBICALLY, APPROVED STANDARD M7-A6, 6th ed. v.23, n. 2, NCCLS: Wayne, 2003.

NETO, A. S. DA S. R. **Glutathione - Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas**. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M. DE; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian journal of food technology**, v. VII BMCFB, p. 107-110, 2009.

NISHIZAWA, T.; SUZUKI, H. Gastric carcinogenesis and underlying molecular mechanisms: and novel targeted therapy. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1-7, 2014.

OLIVEIRA, R. N. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 135-143, 2012.

O'ROURKE J, BODE G. Morphology and Ultrastructure. In: Mobley H.L.T, Mendz G.L, Hazell S.L, editors. ***Helicobacter pylori: Physiology and genetics***. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2452/>

PÁDUA, B. D. C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, p. 381-386, 2010.

PALACIOS-ESPINOSA, J. F. et al. Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, p. 990-998, 2013.

PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International journal of cancer**, v. 118, p. 3030-3044, 2006.

PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, v. 32, p. 419-425, 2009.

PERDIGÃO, T. L. **Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Derg exposta a diferentes concentrações de alumínio**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

PHADNIS, S. H. et al. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. **Infection and immunity**, v. 64, p. 905-912, 1996.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PINHO, R. A. DE et al. Article coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. **Arquivos Brasileiros de cardiologia**, v. 94, p. 515-521, 2009.

POLK, D. B.; PEEK, R. M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, p. 403-414, 2010.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

PULLAR, J. M.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB life**, v. 50, p. 259-266, 2000.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço Redox : NADPH Oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivo Brasileiro de cardiologia**, v. 94, p. 684-693, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, C. R. F. et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, p. 97-101, 2009.

RODRIGUES, F. P. M. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. **Jornal de pediatria**, v. 74, p. 91-98, 1998.

ROOT, R. K. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release from Human granulocytes during phagocytosis regulating factors. **The journal of clinical investigation**, v. 55, p. 945-955, 1975.

SAEED, N.; KHAN, M. R.; SHABBIR, M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. **BMC Complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 1-12, 2012.

SANTOS, V. R. et al. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **International journal of dentistry**, v. 8, p. 1-5, 2009.

SARAFIANOS, S. G. et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 96, p. 10027-10032, 1999.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SELGRAD, M.; BORNSCHEIN, J.; MALFERTHEINER, P. Guidelines for treatment of *Helicobacter pylori* in the East and West. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 9, p. 581-588, 2011.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 1-78, 2015.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, A. R. H. et al. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 74, p. 170-177, 2015a.

SILVA, F. et al. Efficacy of levofloxacin, amoxicillin and a proton pump inhibitor in the eradication of *Helicobacter pylori* in Brazilian patients with peptic ulcers. **Clinics**, v. 70, p. 318-321, 2015b.

SILVA, O. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia macroptera* root. **Fitoterapia**, v. 83, p. 872-876, 2012.

SIMÕES-PIRES, C. A et al. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS / MS with post-column derivatisation. **Phytochemical analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

SINGLETON, V.L., JR., J.A.R., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of enology and viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965

SMOOT, D. T. et al. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 2091-2095, 2000.

SREEJAYAN; RAO, M. N. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 49, p. 105-107, 1997.

SUGANO, K. et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. **Gut**, p. 1-15, 2015.

SUZUMURA, K.; YASUHARA, M.; NARITA, H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1477-1480, 1999.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSU, L. Y. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, p. 3-13, 2014.

TOMBOLA, F. et al. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. **The journal of clinical investigation**, v. 108, p. 803-804, 2001.

TORRES, L. M. B. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 4989-4993, 2002.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Revista Brasileira de hipertensão**, v. 14, p. 269-274, 2007.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular cell**, v. 26, p. 1-14, 2007.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, T. O. et al. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 21, p. 601-607, ago. 2011.

VÍTOR, J. M. B.; VALE, F. F. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. **FEMS Immunology and medical microbiology**, v. 63, p. 153-164, 2011.

VOMERO, N. D.; COLPO, E. Cuidados nutricionais na úlcera péptica. **Arquivos Brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 27, p. 298-302, 2014.

WANG, G.; ALAMURI, P.; MAIER, R. J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. **Molecular microbiology**, v. 61, p. 847-860, 2006.

WANG, Y.; WANG, X. Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles. **Food chemistry**, v. 188, p. 24-29, 2015.

WANNMACHER, L. **Review of the evidence for *H. Pylori* treatment regimens**. 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines, 2011.

WATARI, J. et al. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, p. 5461-5473, 2014.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Molecular microbiology**, v. 40, p. 1249-1259, 2001.

WEN, S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer lett**, v. 282, p. 1-8, 2009.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free radical biology and medicine**, v. 25, p. 434-456, 1998.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clinical microbiology reviews**, 2010.

XIAO, Z. P. et al. Synthesis, structure-activity relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 685-95, 2013.

YORDI, E. G. et al. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. **Nutrition, well-being and health**, p. 23-48, 2012.

ZIELINSKI, A. A. F. et al. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food research international**, v. 60, p. 246-254, 2013.

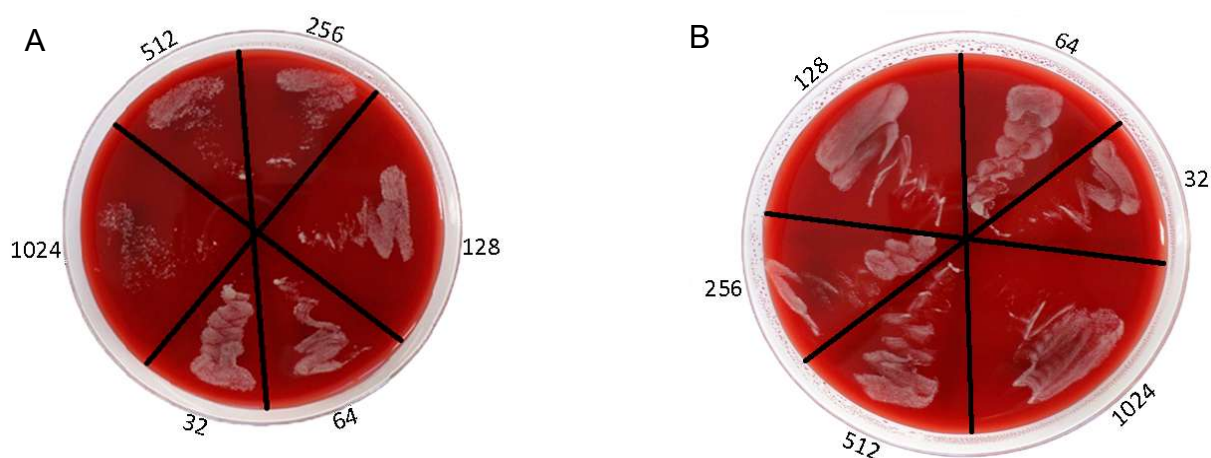
ZIELIŃSKA, D.; ZIELIŃSKI, H. Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies. **Food chemistry**, v. 124, p. 672-678, 2011.

ZHANG, Q. B. et al. Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. **Gut**, v. 38, p. 841-845, 1996.

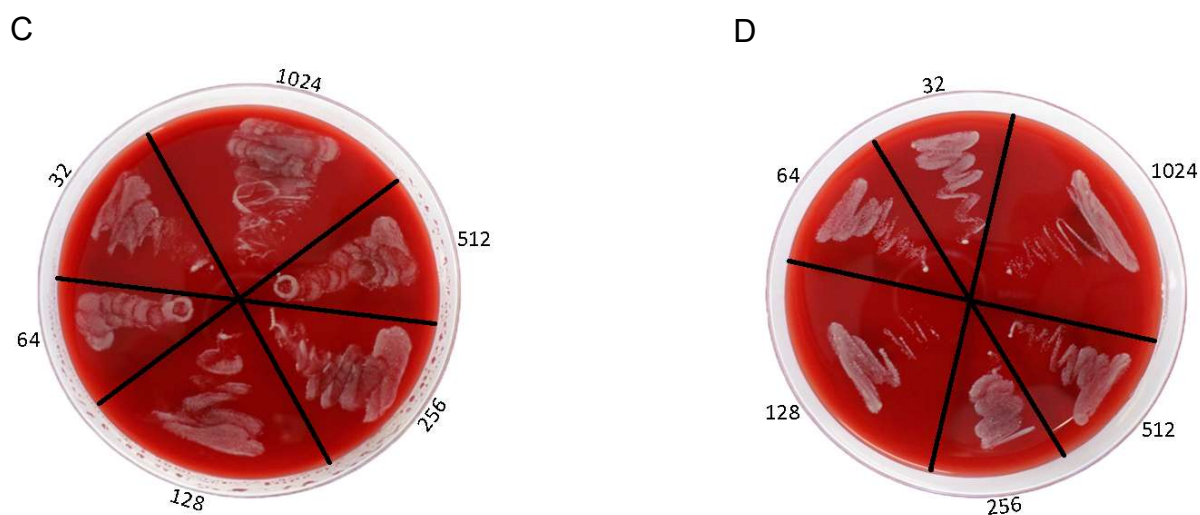
ZHANG, W.; MEN, X.; LEI, P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, p. 14-19, 2014.

ZHAO, S. et al. Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume. **Molecules**, v. 16, p. 8590-8600, 2011.

## 8 APÊNDICE

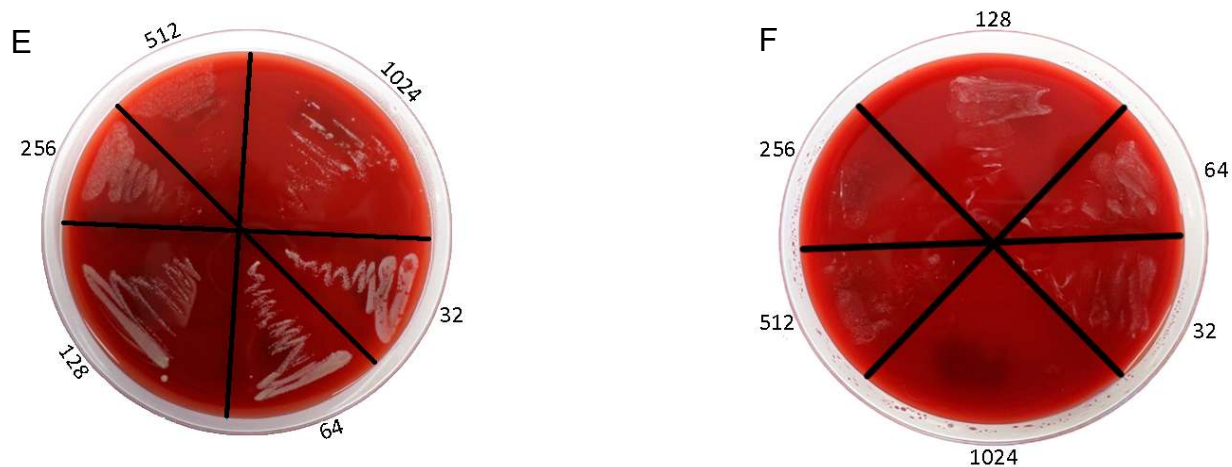


**Figura 1** - Atividade bactericida por meio da determinação da CBM para os extratos de *B. trimera* em variadas concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ): Extrato Hidroalcoólico (EH) - (A) e Extrato Aquoso (EAq) - (B);



**Figura 2** - Atividade bactericida por meio da determinação da CBM para os extratos/frações de *B. trimera* em variadas concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ): Extrato Etanólico (EE) - (C) e Fração Hexânica (FHx) - (D);





**Figura 3** - Atividade bactericida por meio da determinação da CBM para as frações de *B. trimera* em variadas concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ): Fração Aquosa (FAq) - (E) e Fração Acetonitrila/clorofórmio (FAC) - (F)